

**PENGARUH PEMBERIAN SALEP KITOSAN
EKSTRAK CANGKANG RAJUNGAN (*Portunuspelagicus*)
5%**

**PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
LUKA BAKAR TERHADAP
EKSPRESI VEGF DAN
HISTOPATOLOGI**

SKRIPSI

Oleh :

NADILA DWI ASHLINA

145130100111029



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2018

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PEMBERIAN SALEP KITOSAN
EKSTRAK CANGKANG RAJUNGAN (*Portunus pelagicus*)
5%
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
LUKA BAKAR TERHADAP
EKSPRESI VEGF DAN
HISTOPATOLOGI**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
NADILA DWI ASHLINA
145130100111029



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN

Pengaruh Pemberian Salep Kitosan Ekstrak Cangkang Ranjungan (*Portunus pelagicus*) 5% Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Luka Bakar terhadap Ekspresi VEGF dan Histopatologi Kulit

Oleh:

NADILA DWI ASHLINA

NIM. 145130100111029

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 23 Agustus 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

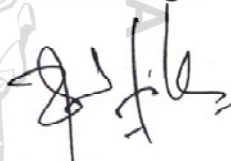
Pembimbing I



Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

Pembimbing II



drh. Dian Vidiastuti, M.Si

NIP. 19820207 200912 2 003

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : NadilaDwiAshlina

NIM : 145130100111029

Program Studi : Pendidikan Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi Berjudul :

Pengaruh Pemberian Salep Kitosan Ekstrak Cangkang Ranjungan
(*Portunus pelagicus*) 5% Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi
Luka Bakar terhadap Ekspresi VEGF dan Histopatologi Kulit

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktubdi isi dan tertulis di daftar pustka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplkan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,

Yang Menyatakan,

(NadilaDwiAshlina)

NIM. 145130100111029

Pengaruh Pemberian Salep Kitosan Ekstrak Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) 5% yang di Induksi Luka Bakar terhadap Ekspresi VEGF dan Histopatologi Kulit

ABSTRAK

Luka bakar adalah suatu trauma yang disebabkan oleh api, arus listrik, bahan kimia, radiasi, dan petir yang mengenai kulit, mukosa maupun jaringan. Kitosan yang terkandung dalam cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dapat digunakan sebagai salah satu alternatif pengobatan luka bakar yang berpotensi untuk meningkatkan proliferasi sel, reepitelisasi, angiogenesis, dan anti bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh terapi salep kitosan ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) terhadap luka bakar tikus putih terhadap makrofag yang mengekspresikan VEGF (*vascular endothelial growth factor*) dan histopatologi kulit. Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) umur 2-3 bulan, dan berat badan <150 g dengan rancangan acak kelompok faktorial (RAKF) 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol ekstrak placenta dan Neomycin sulfat dan perlakuan kitosan 5% selama 7 hari secara topikal dua kali sehari. Pengambilan sampel dilakukan hari ke-1, 3, dan 7 setelah perlakuan. Pengamatan ekspresi VEGF menggunakan metode imunohistokimia (IHK) dengan menghitung jumlah sel makrofag yang teroksidasi dan histopatologi kulit dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin. Data ekspresi VEGF dianalisis dengan Anova faktorial (*general linear model*) yang dilanjutkan dengan uji Tukey $\alpha = 0,05$ dan histopatologi kulit secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa salep ekstrak kitosan cangkang rajungan 5% sebagai terapi luka bakar pada tikus tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) dengan *gold standard* (kombinasi ekstrak plasenta dan Neomycin sulfat) dan dapat menurunkan ekspresi VEGF sebesar 79% pada hari ke 7 serta mampu memperbaiki histopatologi kulit pada proses penyembuhan luka hari ke 7 berdasarkan re-epitelialisasi, pembentukan folikel rambut, kelenjar sebaceous, dan jaringan ikat. Kesimpulan dari penelitian ini adalah penggunaan salep kitosan 5% dapat digunakan untuk terapi topikal pada luka bakar.

Kata kunci : Luka bakar, Histopatologi Kulit, VEGF, Kitosan, Cangkang rajungan.

**The Potency of Chitosan Ointment from Extract of Crab Shell
(*Portunuspelagicus*) 5% Toward VEGF Expression and Skin Histopathology
on Rats (*Rattus norvegicus*) Induced by Burn**

ABSTRACT

Burn is the trauma caused by fire, electric shock, chemicals, radiation and lightning that directly contacted skin, mucosa or tissue. *Chitosan* contained in the crab shell (*Portunus pelagicus*) can be used as an alternative treatment of burn that potentially increases cell proliferation, triggers reepithelialization, stimulates angiogenesis and antibacteria. This research aims to identify the effect of *Chitosan* Ointment that made from crab shell (*Portunuspelagicus*) toward burn-induced rat towards vascular endothelial growth factor (VEGF) and skin histopathology. The research used 24 rats aged 2-3 months, and weight <150 g was analyzed by using Factorial Randomized Block Design (FRBD) three groups of block design: 3 therapies used chitosan 5%, 3 controls used placenta extract and neomycin sulfate for 7 days on topical twice a day. Then each group was observed on day 1, day 3, and day 7. The observation of VEGF expression using immunohistochemistry (IHK) staining by counting the number of expressed macrophage cells and histopathology skin with *hematoxylin-eosin* stain. Data were analyzed with statistical ANOVA Factorial (General linear model), continued by *Tukey* test with $\alpha = 0,05$ and descriptive skin histopathology. The results showed that extract of *chitosan* crab shell (*Portunuspelagicus*) not significantly different ($P > 0,05$) with gold standard (combination extract placenta and Neomycin sulfate), on day 7 could decrease VEGF expression up to 79% and repair histopathology based on reepithelialization, hair follicle, sebaceous glands and connective tissue. In conclusion, the *chitosan* ointment can be used for topical therapy on burn condition.

Key Words : Burn, Skin Histopathology, VEGF, *Chitosan*, Crab Shell

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan segalanikmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Salep Kitosan Ekstrak Cangkang Ranjungan (*Portunus pelagicus*) 5% Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Luka Bakar terhadap Ekspresi VEGF dan Histopatologi Kulit”.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantunya secara langsung maupun tidak langsung dalam menyelesaikan skripsi ini, yaitu :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku dosen pembimbing pertama dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB) yang telah bersedia membimbing dengan penuh kesabaran, memberikan nasihat, arahan, motivasi dan tambahan pengetahuan kepada penulis.
2. drh. Dian Vidiastuti, M.Si sebagai dosen pembimbing kedua, atas dorongan semangat, bimbingan, nasihat, kesabaran, serta tambahan ilmu yang telah diberikan kepada penulis.
3. drh. Aldila Noviatry, M. Biomed sebagai dosen penguji pertama, yang telah memberikan saran dan masukan untuk memperbaiki penelitian dan penulisan skripsi.
4. drh. Galuh Chandra Agustina, M. Si sebagai dosen penguji kedua, yang telah memberikan saran dan masukan untuk memperbaiki penelitian dan penulisan skripsi.

5. Orang tua Neviandridan Yarne, kakak tercinta Yvana Sal Sabiladankedua adik tercinta Adrian Rahmatsyahdan Vania Rahma Putri yang selalumemberikandoa, dukungan, semangatdanmotivasi yang tiadahenti untukpenulissehingga semuanyamenjadilancardalampenelitiandanpenulisan skripsi.
6. Sahabat tercinta Winda Retno A., Putri Rahmaningrum, dan Nanda Ayu yang telahmemberikansemangat, doa, dukungandanmotivasi yang tiadahetisehingga semuanyamenjadilancardalampenelitiandanpenulisan skripsi.
7. Rekan satu tim penelitian Novembrianti H., Annisa W., Garnis Retno S., dan Winda Hermin A., yang telah bekerja dan berjuang bersama dalam penelitian ini.
8. Teman sekaligus keluarga “Chelonia 2014 C”, DPM FKH UB 2017, An- Nahl FKH UB,sertaseluruh mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan yang telahmemberikansemangatdandukungan kepadapenulis.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penulisan skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala kritik dan saran yang membangun. Akhirnya semoga tugas akhir sarjana ini dapat bermanfaat

Malang,..... 2018

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix



DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Luka Bakar	6
2.1.1 Definisi	6
2.1.2 Etiologi Luka Bakar	7
2.1.3 Klasifikasi Luka Bakar	8
2.1.4 Proses Kesembuhan Luka	10
2.1.5 Ekspresi <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF) Pada Proses Kesembuhan Luka	15
2.2 Kulit	16
2.2.1 Anatomi dan Histologi Kulit	17
2.2.1 Fisiologi Kulit	20
2.3 Ranjungan (<i>Portunus pelagicus</i>)	21
2.3.1 Klasifikasi	21
2.3.2 Morfologi Ranjungan (<i>Portunus pelagicus</i>)	22
2.3.3 Kandungan Cangkang Ranjungan (<i>Portunus pelagicus</i>)	24
2.3.4 Kitosan	24
2.4 Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>)	26
2.4.1 Klasifikasi	26
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	28
3.1 Kerangka Konsep	29
3.2 Hipotesis Penelitian	31
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	32
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	32
4.2 Alat dan Bahan	32
4.3 Tahapan Penelitian	33
4.3.1 Rancangan Penelitian	33
4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian	34
4.3.3 Variabel Penelitian	35
4.4 Prosedur Kerja	35
4.4.1 Persiapan Hewan Coba	35
4.4.2 Prosedur Ekstraksi Kitosan Cangkang Rajungan	36
4.4.3 Pembuatan Salep Kitosan Cangkang Rajungan	37
4.4.4 Pembuatan Luka Bakar pada Tikus	38

4.4.5 Terapi Salep Kitosan Cangkang Rajungan	39
4.4.6 Pembuatan Preparat Histologi Kulit	39
4.4.7 Pengamatan Histopatologi Kulit	40
4.4.8 Prosedur Imunohistokimia Ekspresi VEGF	41
4.4.9 Analisa Data	42
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	43
5.1 Pengaruh Terapi Salep Ekstrak Kitosan Cangkang Rajungan (Portunus pelagicus) terhadap Luka Bakar Pada Tikus Putih Berdasarkan Gambaran Makroskopis	43
5.2 Pengaruh Terapi Salep Ekstrak Kitosan Cangkang Rajungan (Portunus pelagicus) terhadap Luka Bakar Pada Tikus Putih Berdasarkan Jumlah VEGF pada Kulit	46
5.3 Pengaruh Terapi Salep Ekstrak Kitosan Cangkang Rajungan (Portunus pelagicus) terhadap Luka Bakar Pada Tikus Putih Berdasarkan Gambaran Histopatologi Kulit	53
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	63
6.1 Kesimpulan	63
6.2 Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	69

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Pengaruh Pemberian Perlakuan Terhadap rata-rata Ekspresi VEGF	49
L.5.1 Data IHK Jumlah Makrofag yang Tereskpresi VEGF	81
L.8.1 Uji Normalitas Data	82
L.8.2 Uji Homogenitas Varian	82

L.8.3 Data Deskriptif	83
L.8.4 Uji <i>General Linear Model</i>	83
L.8.5 Uji Tukey	84



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Histopatologi Luka Bakar dengan Pewarnaan HE perbesaran 10X.....	7
2.2. Struktur Lapisan Kulit.....	17
2.3. Histologi Kulit tikus dengan Pewarnaan HE Perbesaran 10X.....	20

2.4. AnatomiRanjungan	22
4.1 Lempenglogam yang digunakanuntukmenginduksilukabakar.....	39
5.1 GambaranMakroskopis Luka BakarSebelumDiterapi	43
5.2 GambaranMakroskopis Luka BakarSesudahDiterapi.....	45
5.3 Gambaranmikroskopisekspresi VEGF padalukabakar	47
5.4 GrafikRerataJumlahMakrofag yang Terekspresi VEGF.....	49
5.5GambaranHistopatologiPewarnaan HE KelompokTikus Model Luka BakarKelompokKontrolHarike 1	54
5.6GambaranHistopatologiPewarnaan HE KelompokTikus Model Luka BakarKelompokPerlakuanharike 1	55
5.7GambaranHistopatologiPewarnaan HE KelompokTikus Model Luka BakarKelompokKontrolharike 3	57
5.8GambaranHistopatologiPewarnaan HE KelompokTikus Model Luka BakarKelompokperlakuanharike 3	58
5.9GambaranHistopatologiPewarnaan HE KelompokTikus Model Luka BakarKelompokKontrolharike 7	60
5.10GambaranHistopatologiPewarnaan HE KelompokTikus Model Luka BakarKelompokKontrolperlakuanharike 7	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. SertifikatLayakEtik	70
2. UjiKitosanCangkangRanjungan.....	71
3. KerangkaOperasionalPenelitian.....	72
4. LangkahKerjaPenelitian.....	73
5. PerhitunganKonsentresiSalepKitosan 5%.....	79

6. Perhitungan Volume Ketamine-Xylazine	80
7. Data IHK Jumlah Makrofag yang Terespresi VEGF	81
8. Hasil ujistatistikapengaruh ekstraktitosancangkangranjungan terhadap perkembangan ekspresi VEGF pada makrofag kulittikus (<i>Rattus novrgicus</i>) luka bakar.....	82
9. Dokumentasi Penelitian.....	86
10. Peresentase perhitungan peningkatan dan penurunan VEGF.....	87



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persentase
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BNF	<i>Buffer natural formaline</i>
CaCO ₃	Kalsium Karbonat
DAB	<i>Diamanobenzidine</i>



EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor-2</i>
FK	Fakultas Kedokteran
FKH	Fakultas Kedokteran Hewan
g	Gram
g/dL	Gram per desiliter
HE	Hematoksilen-Eosin
IHK	Imunohistokimia
IL-1	Interleukin-1
m ²	Meter kubik
mg/dL	Miligram per desiliter
MgCO ₃	Magensium Karbonat
mL	Mililiter
mm	Milimeter
mmHg	Milimeter Merkuri <i>Hydragyrum</i>
MMP	MatriksMetaloproteinase
NaCl	Natrium Klorida
°C	Derajat Celcius
PAF	<i>Insulinlike growth factor-1</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived growth factor</i>
PF-4	<i>Platelet Factor-4</i>
PMN	Polimorfonuklear
RAK	Rancangan Acak Kelompok
RAKF	Rancanganacakkelompokfaktorial
SA-HRP	<i>Strep Avidin Radish Peroxidine</i>
TGF α	<i>Transforming growth factor α</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tpa	<i>tissue plasminogen activator</i>
UB	Universitas Brawijaya
VEGF	<i>Vascularendotelial growth factor</i>
VEGR	<i>Vascular endothelial growth factor reseptor</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka bakar adalah suatu trauma yang disebabkan oleh api, air panas, arus listrik, bahan kimia, radiasi dan petir yang mengenai kulit, mukosa dan jaringan. Panas yang mengenai tubuh tidak hanya mengakibatkan kerusakan lokal tetapi memiliki efek sistemik. Gejalanya berupa sakit, bengkak, merah, melepuh karena permeabilitas pembuluh darah meningkat. Luka bakar mengakibatkan berbagai masalah seperti, kematian, kecacatan, dan mengeluarkan biaya yang relatif banyak untuk penyembuhan. Luka bakar merupakan salah satu trauma yang sering terjadi dalam kehidupan sehari-hari. (Betz, 2009).

Luka bakar merupakan masalah yang serius dalam dunia kesehatan karena salah satu penyebab keempat trauma dan penyebab paling umum kecacatan dan kematian di seluruh dunia (Ardabili, 2016). Selain itu, merupakan penyebab kematian ketiga akibat kecelakaan pada semua kelompok umur. Menurut Hasdianah (2014) sekitar 90% kejadian luka bakar terjadi di negara berkembang, secara keseluruhan hampir 60% dari luka bakar yang bersifat fatal terjadi di Asia Tenggara dengan tingkat kejadian 110 dari 100.000 penduduk.

Proses penyembuhan luka dapat dibagi dalam tiga fase, yaitu fase inflamasi, proliferasi, dan maturasi. Luka

akan memicu sitokin *growth factor* untuk merangsang respon inflamasi dengan cara menarik sel inflamasi ke daerah luka yaitu neutrofil dan makrofag.

Akibat dari respon luka makrofag akan menstimulasi sekresi VEGF (*vascular endothelial growth factor*) yang berperan penting dalam fase proliferasi. Pada fase proliferasi VEGF bersama *Fibroblast Growth Factor* (FGF) dan *Transforming Growth Factor – Beta* (TGF- β) akan meningkatkan proliferasi dan migrasi sel-sel endotel. Sel endotel yang terstimulasi akan bermigrasi dan membentuk jaringan pembuluh darah (Guyton, 2014).

Selam ini obat yang sering digunakan oleh masyarakat dalam menangani luka bakar mengandung ekstrak plasenta 10%, *neomycin sulfat* 0,5% dan basis gel. Ekstrak plasenta berfungsi sebagai pemicu pembentukan jaringan baru dan *neomycin sulfat* sebagai antibakteri, menyebabkan efek samping iritasi kulit ditandai bintik-bintik merah pada kulit (Burhanudin, 2014). Penanganan luka bakar dengan bahan alam merupakan salah satu cara yang aman untuk mengobati luka bakar. Salah satunya dengan menggunakan kitosan yang dapat berfungsi sebagai antibakteri dan dapat mempercepat infiltrasi sel inflamasi hingga dapat menjadi obat alternatif pengobatan luka bakar.

Kitosan adalah bahan biopolimer alami yang berasal dari kitin, komponen utama dari kerang crustacea luar. Salah satu crustacea yang paling

banyak mengandung kitin adalah rajungan. Pemilihan rajungan sebagai bahan baku pembuatan kitosan di dasarkan pada kadar kitin yang tinggi yakni berkisar antara 20-30% dan bahan yang mudah didapat karena banyak dikonsumsi masyarakat dan cangkangnya merupakan limbah makanan (Sedjati, 2006). Pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kitin yang diubah menjadi kitosan memiliki peran dalam proses penyembuhan luka, yaitu mempercepat infiltrasi, merangsang angiogenesis, mempercepat regenerasi kulit, serta memiliki efek candidacidal dan bakteriosidal (Mori *et al.*, 2005).

Berdasarkan uraian di atas, tujuan penelitian ini difokuskan pada efek salep kitosan ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) terhadap peningkatan ekspresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan histopatologi kulit pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) model luka bakar.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah yang akan diselesaikan adalah.

1. Apakah terdapat pengaruh yang sama antara terapisalep kitosan ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan ekstrak plasenta dan neomycin sulfat terhadap makrofag yang mengekspresikan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) hari ke 1, 3, dan 7 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi luka bakar?

2. Apakah terdapat pengaruh yang sama antara terapis alekitosan ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan ekstrak plasentadan neomycin sulfat terhadap histopatologi kulit harike 1,3, dan 7 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi luka bakar?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) umur 2-3 bulan dengan berat badan ≤ 150 gram yang telah mendapatkan layaketik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan No : 942-KEP-UB (**lampiran 1**).
2. Cangkang rajungan yang digunakan adalah cangkang *Portunus pelagicus* dari pengolahan rajungan di daerah Sampang, Madura.
3. Induksi luka bakar dilakukan melalui kontak langsung dengan plat besi yang telah dimasukkan dalam air bersuhu 100°C durasi 15 menit dilekatkan pada kulit selama 15 detik sehingga dihasilkan luka bakar derajat II tipe dalam (Akhoondinasab, 2014).
4. Pembuatan salekitosan ekstrak cangkang rajungan dilakukan dengan mencampurkan kitosan ekstrak cangkang rajungan dengan konsentrasi 5% (Putri,

2012), kedalamdasarsalep yang dibuatsediaan total sebanyak 22 gram
(lampiran 5).

5. Kombinasi ekstrak plasenta dan Neomycin sulfat didapatkan dari sediaan obat opikal Bioplacenton® dan digunakan sebagai kontrol.
6. Pemberian terapisalep kitosan ekstrak cangkang rajungan pada hewan model dilakukan dua kali sehari sesuai dengan waktu perlakuan.
7. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi VEGF dengan pewarnaan imunohistokimia dan histopatologi kulit dengan preparasi histopatologi kulit dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) perbesaran 100x dan 200x.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan yaitu :

1. Mengetahui apakah terdapat pengaruh yang sama antara terapisalep kitosan ekstrak cangkang rajungan (*Portunus polagicus*) dengan kombinasi ekstrak plasenta dan Neomycin sulfat terhadap makrofag yang mengekspresikan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) hari ke 1, 3, dan 7 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi luka bakar.
2. Mengetahui apakah terdapat pengaruh yang sama antara terapisalep kitosan ekstrak cangkang rajungan (*Portunus polagicus*) dengan kombinasi ekstrak plasenta dan Neomycin

sulfatterhadap histopatologi kulit harike 1,3, dan 7 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi luka bakar.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi tentang pengaruh terapi pemberian salep kitosan ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) untuk mengobati luka bakar.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Luka Bakar

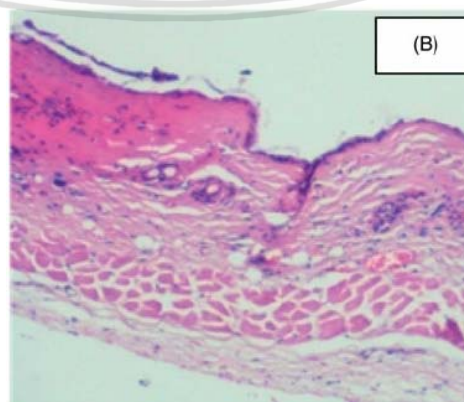
2.1.1 Definisi

Luka bakar atau dalam istilah lain biasa disebut dengan *combustion injury* atau *burn injury* adalah rusaknya sebagian jaringan tubuh yang disebabkan karena perubahan suhu tinggi, sengatan listrik, ledakan, maupun kontak langsung dengan bahan kimia (Smeltzer and Bare, 2010). Luka bakar merupakan salah satu jenis trauma yang memiliki morbiditas dan mortalitas tinggi (Moenadjat, 2003). Luka bakar dapat terjadi pada kulit, selaput lendir, saluran pernapasan, dan saluran cerna. Gejalanya berupa sakit, bengkak, merah, melepuh karena permeabilitas pembuluh darah meningkat (Hasyim dkk., 2012).

Luka bakar mengakibatkan tidak hanya kerusakan pada kulit, tetapi juga memengaruhi seluruh sistem tubuh. Pasien yang mengalami luka bakar luas (mayor) akan menyebabkan ketidakmampuan tubuh dalam mengompensasi dan menyebabkan berbagai macam komplikasi sehingga memerlukan penanganan khusus (Moenadjat, 2003). Kulit dengan luka bakar akan mengalami kerusakan pada epidermis, dermis, maupun subkutan, tergantung faktor penyebab dan lama paparan kulit dengan sumber panas. Kedalaman luka bakar ditentukan oleh tingginya suhu dan lamanya paparan pada kulit (Syamsuhidayat dan Jong, 2005).

2.1.2 Etiologi Luka Bakar

Penyebab luka bakar adalah adanya kontak dan paparan langsung dengan agen termal, kimiawi, listrik, dan radiasi (Betz, 2009). Luka bakar dapat terjadi akibat adanya kontak dengan agen termal kering seperti api dan logam panas, serta agen termal lembap seperti cairan atau gas panas. Luka bakar juga dapat disebabkan oleh kontak dengan agen kimiawi berupa asam, basa, dan muatan organik. Zat kimiawi tersebut dapat mengakibatkan perubahan fisik pada area luka yang terbakar (Grace dan Borley, 2007). Selain agen termal dan kimiawi, luka bakar juga dapat disebabkan kontak dengan objek konduktif dalam saluran listrik yang mengalami korsleting. Trauma listrik serius berasal dari aliran listrik yang melewati jalur organ, otot, dan saraf atau vaskular (Muscari, 2005). Radiasi juga dapat menyebabkan terjadinya luka bakar yang disebabkan oleh paparan sinar matahari, terapi medis, serta agen radiasi kuat lain. Pada tahap awal radiasi mengakibatkan luka bakar dengan kedalaman sebagian tetapi dapat berlanjut ke trauma yang lebih dalam (Grace dan Borley, 2007).



Gambar 2.1 Histopatologi Luka bakar dengan pewarnaan HE perbesaran 10X (Chibber *et al.*, 2015).

2.1.3 Klasifikasi Luka Bakar

Klasifikasi luka bakar menurut kedalaman adalah sebagai berikut :

a. Luka bakar derajat I

Kerusakan terbatas pada lapisan epidermis superfisial, kulit kering hiperemik, berupa eritema, tidak dijumpai pula nyeri karena ujung – ujung syaraf sensorik teriritasi, penyembuhannya terjadi secara spontan dalam waktu 5 -10 hari (Barbul, 2005).

b. Luka bakar derajat II

Kerusakan terjadi pada seluruh lapisan epidermis dan sebagai lapisan dermis, berupa reaksi inflamasi disertai proses eksudasi. Dijumpai pula, pembentukan scar, dan nyeri karena ujung –ujung syaraf sensorik teriritasi. Dasar luka berwarna merah atau pucat (Moenadjat, 2009).

I. Derajat II Dangkal (*Superficial*)

Kerusakan mengenai bagian superficial dari dermis. Organ-organ kulit seperti folikel rambut, kelenjar keringat, kelenjar sebacea masih utuh. Bila mungkin tidak terbentuk beberapa jam setelah cedera, dan luka bakar pada mulanya tampak seperti luka bakar derajat I dan mungkin terdiagnosa sebagai derajat II superficial setelah 12-24 jam. Ketika bula dihilangkan, luka tampak berwarna merah muda dan basah. Jarang menyebabkan *hypertrophic scar*. Jika infeksi dicegah maka penyembuhan akan terjadi secara spontan kurang dari 3 minggu (Barbul, 2005).

II. Derajat II Dalam (*Deep*)

Kerusakan derajat II dalam menyebabkan kerusakan jaringan meliputi 1/2 sampai 7/8 bagian lapisan dermis. Organ-organ kulit seperti folikel-folikel rambut, kelenjar keringat, kelenjar sebacea mengalami kerusakan. Penyembuhan terjadi lebih lama tergantung sel epitel yang tersisa. Juga dijumpai bula, akan tetapi permukaan luka biasanya tampak berwarna merah muda dan putih segera setelah terjadi cedera karena variasi suplay darah dermis (daerah yang berwarna putih mengindikasikan aliran darah yang sedikit atau tidak ada sama sekali, daerah yg berwarna merah muda mengindikasikan masih ada beberapa aliran darah). Jika infeksi, luka bakar akan sembuh dalam 3 -9 minggu (Barbul, 2005).

c. Luka bakar derajat III (*Full Thickness burn*)

Kerusakan meliputi seluruh tebal dermis dan lapisan lebih dalam, tidak dijumpai bula, appendises kulit rusak, kulit yang terbakar berwarna putih dan pucat. Karena kering, letaknya lebih rendah dibandingkan kulit sekitar. Terjadi koagulasi protein pada epidermis yang dikenal sebagai scar, tidak dijumpai rasa nyeri dan hilang sensasi, oleh karena ujung –ujung syaraf sensorik mengalami kerusakan atau kematian. Penyembuhan terjadi lama karena tidak ada proses epitelisasi spontan dari dasar luka (Moenadjat, 2009).

d. Luka bakar derajat IV

Luka full thickness yang telah mencapai lapisan otot, tendon dan tulang dengan adanya kerusakan yang luas. Kerusakan meliputi seluruh dermis, organ-organ kulit seperti folikel rambut, kelenjar sebacea dan kelenjar keringat mengalami kerusakan, tidak dijumpai bula, kulit yang terbakar berwarna abu-abu dan pucat, terletak lebih rendah dibandingkan kulit sekitar, terjadi koagulasi protein pada epidemis dan dermis yang dikenal scar, tidak dijumpai rasa nyeri dan hilang sensorik karena ujung-ujung syaraf sensorik mengalami kerusakan dan kematian. Penyembuhannya terjadi lebih lama karena ada proses epitelisasi spontan dan rasa luka (Moenadjat, 2009).

2.1.4 Proses Kesembuhan Luka

Fase penyembuhan luka pada respon normal mamalia yang mengalami defek akibat kerusakan integritas kulit terbagi atas beberapa fase, yaitu fase inflamasi, fase proliferasi, fase maturasi dan *remodeling*.

1. Fase Inflamasi

Ketika pembuluh darah pecah, proses pembekuan dimulai dari rangsangan kolagen terhadap platelet. Agregasi platelet bersama dengan eritrosit akan menutup kapiler untuk menghambat pendarahan. Selanjutnya, sel yang mengalami kerusakan akan mengeluarkan sitokin proinflamasi yang berfungsi sebagai faktor kemotaktik dari sel radang seperti sel polimorfonuklear, makrofag, dan limfosit yang bergerak menuju area luka (Eming *et al.*, 2007).

Neutrofil merupakan sel radang pertama yang dijumpai pada daerah luka, biasanya mulai muncul dalam 24 jam pertama setelah kerusakan, fungsi utamanya untuk mengeliminasi benda asing, bakteri, sel dan matrik jaringan yang rusak. Sel Mast merupakan sel yang kaya dengan granula berisi berbagai macam enzim, histamin dan berbagai jenis mediator kimia lain yang bertanggung jawab terhadap terjadinya inflamasi pada daerah sekitar luka. Bahan aktif yang dilepaskannya akan memicu serangkaian proses yang menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah sehingga sel monosit bisa dengan mudah bermigrasi ke dalam jaringan yang luka (Eming *et al.*, 2007).

Sel Monosit dalam darah akan menjadi teraktivasi dan menjadi Makrofag setelah 48 jam, yang berperan besar dalam tahap inflamasi penyembuhan luka dan gangguan terhadap fungsi Makrofag akan mengganggu penyembuhan luka. Setelah teraktivasi, sel Makrofag sendiri juga akan menghasilkan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) dan *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β). Sifat fagositik dari Makrofag bertujuan untuk mengeliminasi sel dan matrik yang rusak, Netrofil yang penuh dengan patogen, benda asing dan sisa bakteri yang masih tersisa. Adanya *wound macrophage* menandakan akhir proses inflamasi dan segera dimulainya proses proliferasi. Limfosit juga dijumpai pada lokasi terjadinya luka, namun sel ini dinyatakan tidak terlalu memiliki peran yang menonjol dalam proses penyembuhan luka dan peran pastinya masih perlu ditelaah lebih lanjut (Eming *et al.*, 2007).

2. Fase Proliferasi (Fibroblas, Regenerasi)

Proliferasi sel umumnya dirangsang oleh faktor pertumbuhan intrinsik, luka, kematian sel, atau bahkan oleh deformasi mekanis jaringan. Sel yang sedang berproliferasi berkembang melalui serangkaian tempat dan fase yang sudah ditentukan yang disebut siklus sel. Siklus sel tersebut terdiri atas fase pertumbuhan prasinthesis 1 atau G1, fase sintesis DNA atau S, fase pertumbuhan pramitosis 2 atau G2, dan fase mitosis atau M. sel istirahat berada dalam keadaan fisiologis yang disebut G0 (Guyton, 2014).

Pemulihan jaringan yang cedera dilakukan dengan pemusnahan dan pembuangan jaringan yang rusak (melalui proses peradangan yang telah disebutkan di atas), regenerasi sel atau pembentukan jaringan granulasi. Meskipun sebagian besar jaringan tersusun terutama dari sel-sel dalam G0 (yang secara berkala memasuki siklus sel) terdapat juga kombinasi sel-sel yang saling membelah, sel-sel yang mengadakan diferensiasi akhir dan sel-sel induk. Luka jaringan berat atau menetap yang disertai kerusakan pada sel parenkim dan kerangka dasar jaringan menimbulkan suatu keadaan yang pemulihannya tidak dapat dilaksanakan melalui regenerasi parenkim saja. Pemulihan terjadi melalui penggantian sel parenkim nonregeneratif oleh jaringan ikat.

Proses ini memiliki tiga komponen umum yaitu, pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), migrasi dan proliferasi fibroblas dan deposisi matriks ekstraselular. Pemulihan dimulai dalam waktu 24

jam setelah luka melalui migrasi fibroblas dan induksi proliferasi fibroblas dan sel endotel. Rekrutmen dan stimulasi fibroblas dikendalikan oleh banyak faktor pertumbuhan, meliputi *PDGF*, faktor pertumbuhan fibroblas dasar *basal fibroblast growth factor (bFGF)* dan *TGF- β* . Sumber dari berbagai faktor ini antara lain: endotel yang teraktivasi dan sel radang terutama sel makrofag (Guyton, 2014).

Setelah 3-5 hari, muncul jenis jaringan khusus yang mencirikan terjadinya penyembuhan yang disebut jaringan granulasi. Gambaran makroskopisnya adalah berwarna merah muda, lembut dan bergranulasi, seperti yang terlihat di bawah keropeng pada luka kulit. Gambaran histologisnya ditandai dengan proliferasi fibroblas dan kapiler baru yang halus dan berdinding tipis di dalam matriks ekstraselular yang longgar (Guyton, 2014).

Awal penyembuhan, fibroblas mempunyai kemampuan kontraktile dan disebut miofibroblas, yang mengakibatkan tepi luka akan tertarik dan kemudian mendekat, sehingga kedua tepi luka akan melekat. Berlangsungnya penyembuhan membuat fibroblas bertambah. Sel ini menghasilkan kolagen, sehingga jaringan granulasi yang kemudian akan mengumpulkan matriks jaringan ikat secara progresif, akhirnya akan menghasilkan fibrosis padat (pembentukan jaringan parut kolagen), yang dapat melakukan *remodelling* lebih lanjut sesuai perjalanan waktu (Guyton, 2014).

3. Fase Pematangan dan *Remodelling*

Pada fase ini terjadi proses pematangan yang terdiri dari penyerapan kembali jaringan yang berlebih, pengerutan sesuai dengan gaya gravitasi, dan akhirnya membuat kembali jaringan yang baru terbentuk. Fase ini berlangsung selama berbulan-bulan dan dinyatakan berakhir apabila semua tanda radang sudah lenyap. Tubuh berusaha menormalkan kembali semua yang menjadi abnormal karena proses penyembuhan edema dan sel radang diserap, sel yang sedang berproliferasi menjadi matang, kapiler baru menutup dan diserap kembali, kolagen yang berlebih diserap dan sisanya mengerut sesuai dengan regangan yang ada. Selama proses ini dihasilkan jaringan parut yang pucat, tipis dan lemas serta mudah digerakkan dari dasar. Pengerutan maksimal terlihat pada luka. Pada akhir fase ini, permukaan luka kulit mampu menahan regangan kira-kira 80% kemampuan kulit normal. Hal ini tercapai kira-kira 3-6 bulan setelah penyembuhan (Sjamsuhidayat, 2005).

Penyembuhan luka sangat penting untuk mengembalikan integritasnya sesegera mungkin dan merupakan suatu proses kompleks dan dinamis dengan pola yang dapat diprediksikan. Fase proliferasi merupakan salah satu tahap penting pada penyembuhan luka dan terjadi setelah fase inflamasi (Atik dan Iwan, 2009). Fase proliferasi atau fase fibroplasia akan cepat terjadi, apabila tidak ada infeksi dan kontaminasi pada fase inflamasi (Suriadi, 2007).

Penyembuhan luka sangat diperlukan untuk mendapatkan kembali jaringan tubuh yang utuh. Beberapa faktor yang berperan dalam mempercepat penyembuhan, yaitu faktor internal (dari dalam tubuh) dan faktor eksternal (dari luar tubuh). Faktor eksternal yang dapat mempercepat penyembuhan luka yaitu dengan cara irigasi luka menggunakan larutan fisiologis (NaCl 0,9%) serta penggunaan obat-obatan sintetik dan alami (Suriadi, 2007)

2.1.5 Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) Pada Proses Kesembuhan Luka

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) merupakan faktor angiogenesis yang berfungsi untuk membentuk pembuluh darah baru pada jaringan luka. Pada proses kesembuhan luka, VEGF akan muncul pada fase proliferasi. Munculnya VEGF menandakan adanya kesembuhan luka dari fase inflamasi menuju proliferasi (Sabirin, 2013). Produksi VEGF dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan lain seperti *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) dan *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β). Produksi dan aktivitas VEGF dalam proses angiogenesis akan meningkat pada fase awal terjadinya luka yaitu saat pembuluh darah mengalami hipoksia, setelah itu VEGF akan menurun saat neovaskularisasi telah sempurna serta perfusi di area luka telah kembali normal (Nofikasari dkk, 2016).

VEGF berperan sebagai mitogen yang terbatas pada sel endotel vascular. VEGF terlibat dalam banyak tahapan angiogenik yang meliputi stimulasi degradasi matriks ekstraseluler disekitar endotel, meningkatkan

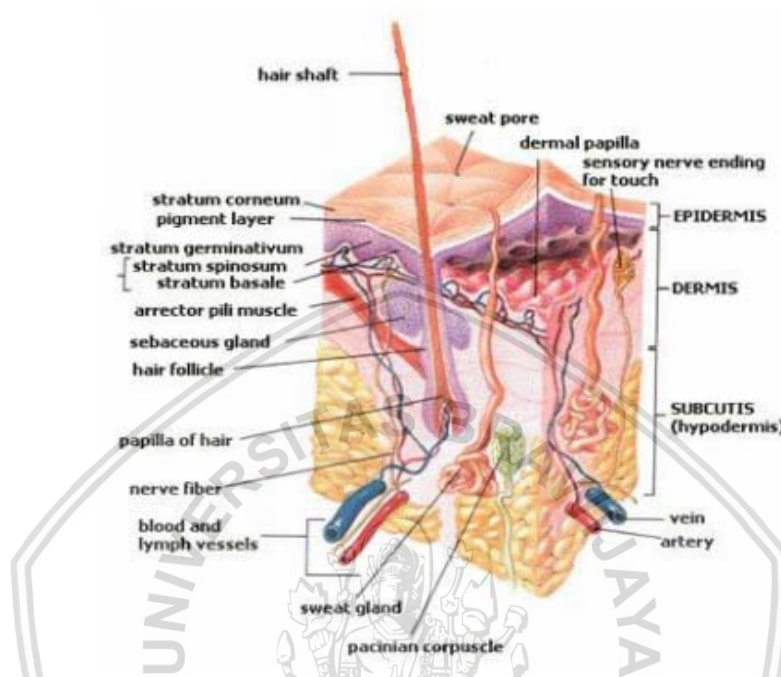
proliferasi dan migrasi sel endotel serta membantu pembentukan struktur pembuluh darah (Briant, 2007). VEGF akan mengikat reseptor *transmembrane tirosin kinase* yang berbeda. *Vascular Endothelial Growth Factor Reseptor-1* (VEGFR-1) dan *Vascular Endothelial Growth Factor Reseptor-2* (VEGFR-2) dapat ditemui pada permukaan endotel pembuluh darah. VEGFR-2 berperan dalam kemotaksis dan proliferasi sel endotel dan juga induksi diferensiasi endotel. Sedangkan, VEGFR-1 dibutuhkan dalam mediasi permeabilitas pembuluh darah serta ekspresi *Matrix Metalloproteinases* (MMP) dalam sel-sel otot polos vaskuler (Djawa dan Susilo, 2013).

2.2 Kulit

Kulit merupakan lapisan atau jaringan yang menutupi seluruh tubuh dan melindungi tubuh dari berbagai macam trauma baik trauma fisik maupun yang disebabkan oleh bakteri, virus, dan jamur. Kulit juga merupakan salah satu panca indera yang terletak di permukaan tubuh sehingga berkaitan dengan letaknya yang ada di permukaan tubuh maka kulit merupakan organ pertama yang terkena pengaruh tidak menguntungkan dari lingkungan (Santoso, 2001). Kulit adalah pembungkus elastis yang berfungsi melindungi tubuh dari pengaruh lingkungan, serta merupakan alat tubuh yang memiliki ukuran terluas, yaitu 15% dari berat tubuh dan luas 1,50–1,75 m² (Goeser, 2008).

Integumen atau kulit merupakan jaringan yang menutupi permukaan tubuh, yang terdiri atas 3 lapisan, dapat dilihat pada **Gambar 2.1**, yaitu

epitel yang disebut epidermis, jaringan pengikat yang disebut dermis atau korium, dan sub-kutis atau hipodermis (Goeser, 2008).



Gambar 2.2. Struktur Lapisan Kulit (Goeser, 2008)

2.2.1 Anatomi dan Histologi Kulit

Anatomi dan histologi kulit tikus sebenarnya mirip dengan mamalia lainnya, terdiri dari bagian luar epidermis yang menutupi jaringan ikat di bagian dermis dan bagian bawah hypodermis yang sebagian besar terdiri dari lemak. Kulit terdiri dari tiga lapisan utama dapat dilihat pada **Gambar 2.2** yaitu (Scudamore, 2014) :

- a. Epidermis terdiri dari sel epitel yang mengalami keratinisasi yang mengandung bahan lemak yang menjadikan kulit kedap air. Namun bagian epidermis pada tikus dewasa mungkin hanya terlihat satu sampai dua lapisan walaupun masih terdiri dari lima lapisan (Scudamore, 2014).

Epidermis terdiri dari epitel pipih banyak lapis bertanduk, yang memiliki lima lapisan utama, yaitu :

- *Stratum Basal*

Lapisan basal merupakan lapisan epidermis paling bawah dan berbatasan dengan dermis. Dalam lapisan basal terdapat melanosit. Melanosit adalah sel dendritik yang membentuk melanin. Melanin berfungsi melindungi kulit terhadap sinar matahari.

- *Stratum Spinosum*

Lapisan *spinosum* atau disebut juga *prickle cell layer* (Lapisan akanta) merupakan lapisan epidermis yang paling kuat dan tebal. Terdiri dari beberapa lapis sel yang berbentuk poligonal yang besarnya berbeda-beda akibat adanya mitosis serta sel inti makin dekat ke permukaan makin gepeng bentuknya. Pada lapisan ini banyak mengandung glikogen.

- *Stratum Granulosum*

Lapisan granulosum terdiri dari dua atau tiga lapis sel gepeng, berisi butir-butir (granul) keratohialin yang basofilik. *Stratum granulosum* juga tampak jelas pada telapak kaki.

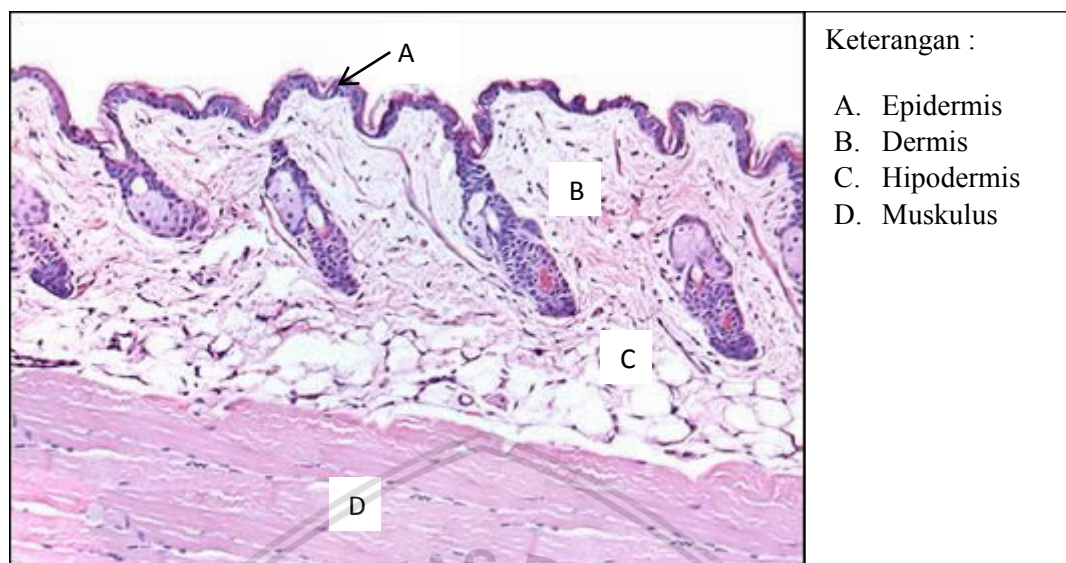
- *Stratum Lucidum*

Lapisan *lucidum* terletak tepat dibawah lapisan korneum. Terdiri dari sel-sel gepeng tanpa inti.

- *Stratum Korneum*

Lapisan tanduk merupakan lapisan terluar yang terdiri dari beberapa lapis sel-sel gepeng yang mati, dan tidak berinti mengandung keratin. Pada permukaan lapisan ini terus menerus mengelupas.

- b. Dermis terdiri dari dua lapisan yaitu *stratum papilare* (*stratum spongiosum*) dan *stratum retikulare* (*Stratum Kompaktum*). *Stratum papilare* merupakan bagian yang menonjol ke epidermis berisi ujung serabut saraf dan pembuluh darah. Lapisan ini terdiri atas fibroblas dan jenis sel jaringan ikat lain, tersebar luas antar berkas-berkas serat kolagen tipe III. Zat tanduk dan fibroblas banyak pada lapisan ini. *Stratum retikulare* merupakan bagian yang menonjol ke arah sub kutan. Lebih tebal dibanding *stratum papilare*. Lapisan ini sendiri terdiri atas serabut-serabut penunjang, seperti serabut kolagen, elastin dan retikulin (Novitasari, 2009).
- c. Hipodermis merupakan zona transisional diantara kulit dan muskulus. Terdiri dari lapisan lemak, jaringan ikat yang menghubungkan kulit dengan jaringan dibawah. Lapisan hypodermis memiliki fungsi sebagai penunjang suplai darah ke dermis, melekatkan kulit pada daerah di bawah, isolasi panas, dan sebagai cadangan kalori (Goeser, 2008).



Gambar 2.3 Histologi Kulit tikus dengan Pewarnaan HE Perbesaran 10X (Batcha, 2000).

2.2.2 Fisiologi Kulit

Kulit merupakan organ yang berfungsi sangat penting bagi tubuh diantaranya adalah memungkinkan bertahan dalam berbagai kondisi lingkungan, sebagai *barrier* infeksi, mengontrol suhu tubuh (thermoregulasi), sensasi, eksresi, dan metabolisme. Fungsi proteksi kulit adalah untuk melindungi dari kehilangan cairan elektrolit, trauma mekanik, ultraviolet, dan sebagai *barrier* dari invasi mikroorganisme patogen (Pearce, 2009).

Kulit berperan pada pengaturan suhu dan keseimbangan cairan elektrolit termoregulasi dikontrol oleh hipotalamus. Temperatur perifer mengalami proses keseimbangan melalui keringat, *insensible loss* dan kulit, paru-paru dan mukosa bukal. Temperatur kulit dikontrol dengan dilatasi atau kontriksi pembuluh darah kulit. Bila temperatur meningkat akan terjadi vasodilatasi pembuluh darah, kemudian tubuh akan mengurangi temperatur dengan melepas panas dari kulit dengan cara mengirim sinyal kimia yang

dapat meningkatkan aliran darah di kulit. Pada temperatur yang menurun, pembuluh darah akan mengalami vasokonstriksi yang kemudian akan mempertahankan panas (Pearce, 2009).

2.3 Rajungan (*Portunus pelagicus*)

2.3.1 Klasifikasi

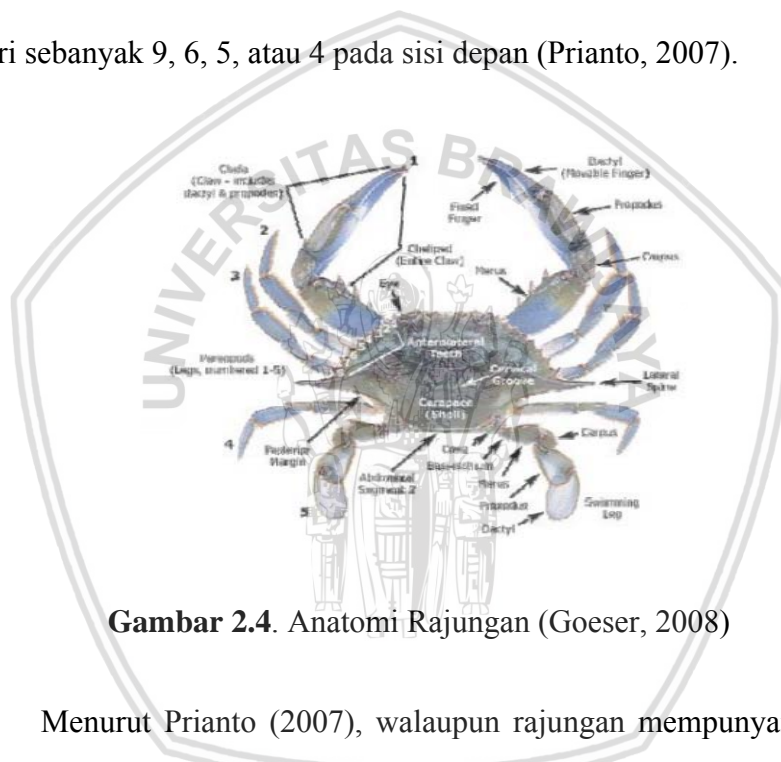
Rajungan adalah kepiting yang hidup di perairan laut dan jarang naik ke pantai. Ada dua jenis kepiting yang memiliki nilai komersil, yakni kepiting bakau dan rajungan. Rajungan terdiri atas 7 spesies dan ketujuhanya ditemukan di Indonesia, yaitu *Portunus pelagicus*, *P. sanguinolentus*, *Thalamita crenata*, *Thalamita danae*, *Charybdis crusiata*, *Charibdis natator*, dan *Podophthalmus vigil* (Yanuar, 2013).

Klasifikasi rajungan (*Portunus pelagicus*) menurut Saanin (1984) adalah sebagai berikut:

Filum	: Arthropoda
Kelas	: Crustacea
Subkelas	: Malacostraca
Ordo	: Eucaridae
Subordo	: Decapoda
Famili	: Portunidae
Genus	: Portunus
Spesies	: <i>Portunus pelagicus</i>

2.3.2 Morfologi Rajungan(*Portunus pelagicus*)

Morfologi Rajungan dapat dilihat pada **Gambar 2.2**. Famili Portunidae mempunyai karapas atau cangkang lebar sekali, lebarnya dapat mencapai 2/3 kali panjangnya. Dahi bergigi empat buah, gigi sebelah luar lebih besar dan lebih menonjol, gigi ini lebih rendah dan lebih membulat pada individu yang belum dewasa. Capit memanjang, kokoh, mempunyai duri sebanyak 9, 6, 5, atau 4 pada sisi depan (Prianto, 2007).



Mulut rajungan terbuka dan terletak pada bagian bawah tubuh. Beberapa bagian yang terdapat di sekitar mulut berfungsi memegang makanan dan juga memompakan air dari mulut ke insang. Rajungan memiliki rangka luar yang keras sehingga mulutnya tidak dapat dibuka lebar. Menurut Juwana (2000), rajungan dan kepiting sebenarnya satu famili. Karapasnya mempunyai pinggiran samping depan yang bergerigi dan jumlah giginya sembilan buah. Perutnya atau yang biasa disebut abdomen terlipat ke depan di bawah karapas. Abdomen jantan sempit dan meruncing ke depan. Abdomen betina melebar dan membulat penuh dengan embelan, gunanya untuk menyimpan telur.

Kepiting menemukan makanannya menggunakan rangsangan bahan kimia yang dihasilkan oleh organ tubuh. Antena memiliki indera penciuman yang mampu merangsang kepiting untuk mencari makan. Ketika alat pendeteksi pada kaki melakukan kontak langsung dengan makanan, *Chelipeds* dengan cepat menjepit makanan tersebut dan langsung dimasukkan ke dalam mulut. Mulut kepiting juga memiliki alat penerima sinyal yang sangat sensitif untuk mendeteksi bahan-bahan kimia. Kepiting mengandalkan kombinasi organ perasa untuk menemukan makanan, pasangan dan menyelamatkan diri dari predator (Prianto, 2007).

Kepiting termasuk dalam beberapa suku (familia), Portunidae dan seksi (*sectio*) *Brachyura*. Rajungan (*Portunus pelagis*) sering berganti kulit secara teratur. Kulit kerangka tubuhnya terbuat dari bahan berkapur dan karenanya tak dapat terus tumbuh. Jika ia akan tumbuh lebih besar maka

kulitnya akan retak pecah dan dari situ akan keluar individu yang lebih besar dengan kulit yang masih lunak. Rajungan yang baru berganti kulit, tubuhnya masih sangat lunak. Masa selama bertubuh lunak ini merupakan masa yang sangat rawan dalam kehidupannya, karena pertahanannya pun sangat lemah. (Juwana, 2000)

2.3.3 Kandungan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*)

Muskar (2007) menyatakan bahwa cangkang rajungan diekspor dalam bentuk kering sebagai sumber kitin, kitosan dan karotenoid yang dimanfaatkan oleh berbagai industri sebagai bahan baku obat, kosmetik, pangan dan lain-lain. Bahan-bahan tersebut memegang peranan sebagai anti virus, anti bakteri dan digunakan juga sebagai obat untuk meringankan dan mengobati luka. Selain itu cangkang rajungan dapat juga digunakan sebagai bahan pengawet makanan yang murah dan aman seperti kitosan. Kandungan gizi tepung cangkang rajungan dalam persen yaitu kadar air 4,45, kadar abu 55,21, kadar lemak 0,54, kadar protein 13,58, kadar kalsium 24,78, dan kadar fosfor 0,49 (BBPMHP, 2000).

2.3.4 Kitosan

Kitosan merupakan sebuah polimer alam yang berasal dari limbah *crustaceae* seperti udang dan kepiting. Kitosan bersifat tidak toksik. Biokompatibilitas, *biodegradabilitas*, *bioadhesif*, *mukoadhesif*, dan mudah dimodifikasi secara kimia sehingga telah banyak diaplikasikan dalam dunia farmasi. Film kitosan dapat digunakan sebagai pembalut luka dan mampu mempercepat kesembuhan luka serta menghambat

keloid. Membran kitosan dapat menutupi permukaan kulit yang secara sempurna menempel baik di permukaan kulit. Kitosan memiliki aktivitas antibakteri dan antifungi yang dapat menghambat infeksi, menurunkan kontraksi, mempercepat penutupan dan proses penyembuhan luka (Ramisz *et al*, 2007)

Kitosan dapat meningkatkan kolagenisasi, fibroblas dan vaskularisasi (pembuluh darah). Hal ini berdasarkan penelitian Chiba *et al.*, pada tahun 2006 yang menyatakan bahwa hewan yang diberi perlakuan kitosan menunjukkan resolusi yang lebih cepat pada pembentukan pembuluh darah baru, induksi fibroblas yang lebih besar, dan produksi serat kolagen dibandingkan dengan kontrol. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa proliferasi fibroblas dan peningkatan jumlah kapiler diobservasi pada kelompok kontrol dan perlakuan, namun granulasi jaringan lebih banyak terdapat pada kelompok kitosan. Hasil ini menjelaskan bahwa kitosan sendiri memfasilitasi penyembuhan luka (Mizuno *et al.*, 2002). Kitosan akan melepas *N-acetyl-b-D-glucosamine* yang menginisiasi proliferasi fibroblas, membantu mengatur deposisi kolagen dan menstimulasi peningkatan level dari sintesis asam hialuronik alami pada luka. Hal tersebut membantu mempercepat penyembuhan luka dan mencegah terbentuk bekas luka. Pada fase awal proses penyembuhan luka, makrofag mengeluarkan kolagenase yang memproduksi kolagen dan melepaskan sitokin (Jinab *et al.*, 2006).

2.4 Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

2.4.1 Klasifikasi

Berikut ini adalah klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* menurut Adiyati (2011).

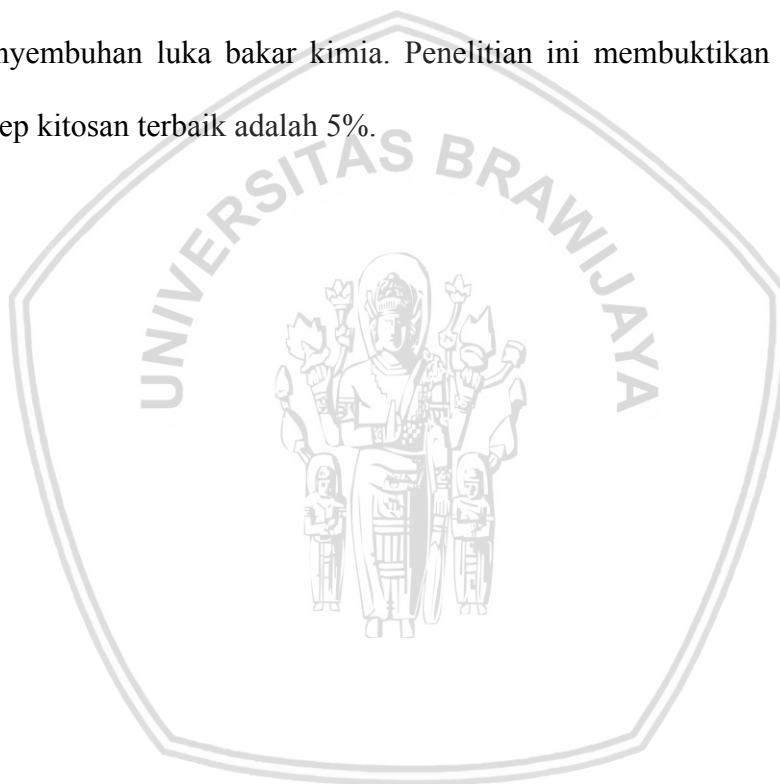


Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Sub-Famili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Menurut Adiyati (2011), hewan coba merupakan hewan yang dikembangkan biakkan untuk digunakan sebagai hewan uji coba. Tikus sering digunakan pada berbagai macam penelitian medis selama bertahun-tahun. Hal ini dikarenakan tikus memiliki karakteristik genetik yang unik, mudah berkembang biak, murah serta mudah untuk mendapatkannya. Salah satu penelitian ilmiah yang menggunakan tikus adalah induksi luka bakar.

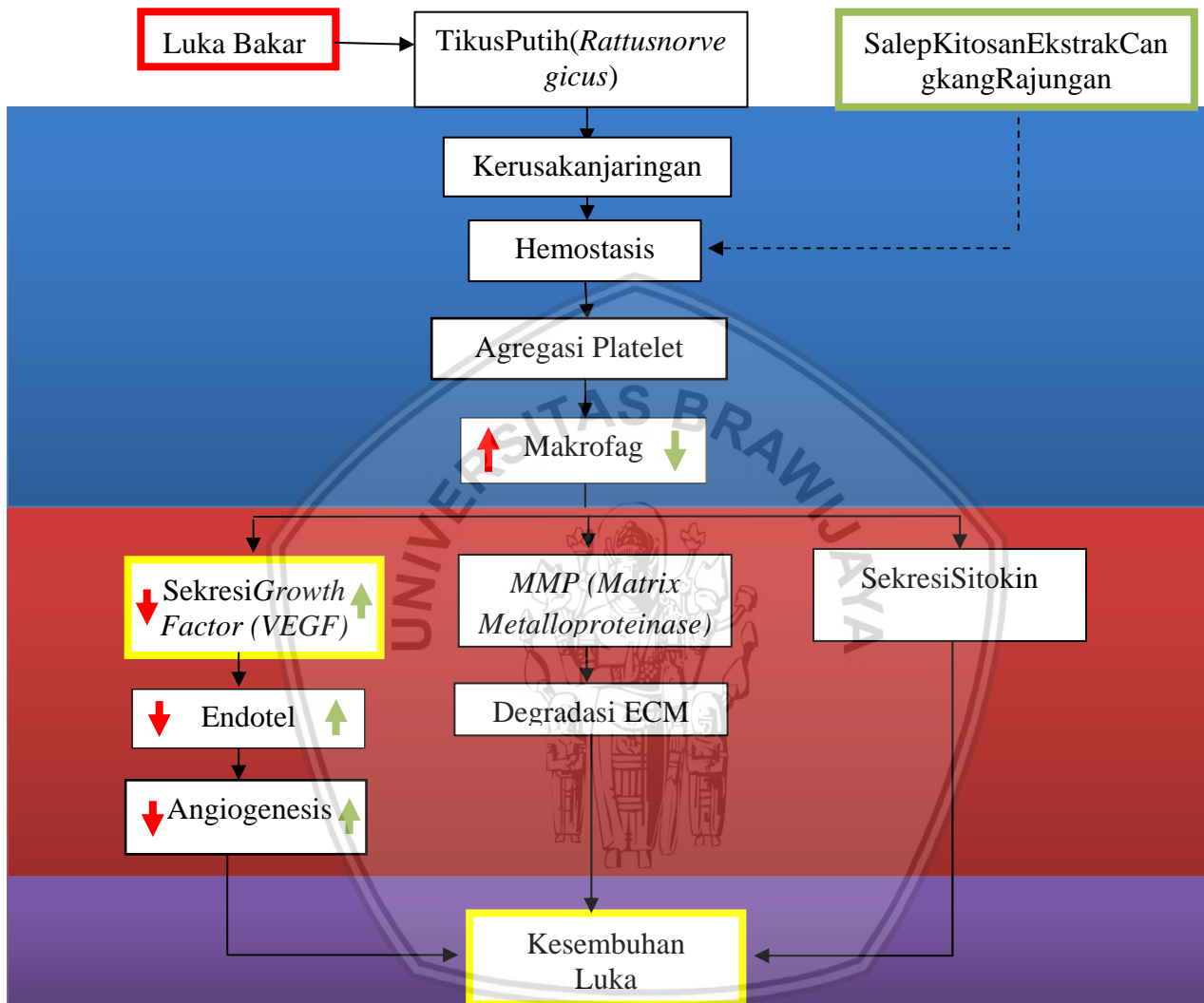
Penelitian Balqis, dkk. (2014), tikus putih digunakan dengan induksi luka bakar derajat II dalam yang diterapi menggunakan daun kedondong (*Spondias dulcis F*) dan minyak kelapa. Penelitian tersebut mengamati

gambaran histopatologi penyembuhan luka dilihat dari reaksi inflamasi dan distribusi jaringan kolagen pada fase poliferasi. Hasil yang dilaporkan, bahwa terapi menunjukkan gambaran hitopatologi penyembuhan luka yang lebih baik dibandingkan kelompok kontrol positif. Penelitian Putri, dkk (2012), tikus putih digunakan sebagai hewan model luka bakar kimia derajat III, dimana penelitian ini menguji efektivitas salep kitosan terhadap penyembuhan luka bakar kimia. Penelitian ini membuktikan bahwa dosis salep kitosan terbaik adalah 5%.



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

- | | |
|---|-------------------------|
| ↕ : Efek terapi salep kitosan ekstrak cangkang rajungan | ----- : Pengaruh Terapi |
| ↕ : Efek induksi luka bakar | ↓ : Stimulus |
| □ : Induksi salep kitosan | ■ : Fase Inflamasi |
| □ : Variabel yang diteliti | ■ : Fase Proliferasi |
| □ : Induksi luka bakar | ■ : Fase Re-modelling |

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberikan perlakuan lukabakar yang akan mengalami kerusakan jaringan kulit pada derajat II dalam. Derajat II dalam menyebabkan kerusakan jaringan meliputi 1/2 sampai 7/8 bagian lapisan dermis. Kerusakan lapisan dermis berupa rusaknya folikel rambut, kelenjar keringat disertai dengan kerusakan pembuluh darah.

Selanjutnya, rangkaian proses penyembuhan luka dimulai sesaat setelah proses luka terjadi. Fase pertama yaitu fase inflamasi yang diawali dengan hemostasis. Ketika pembuluh darah pecah, proses pembekuan dimulai dari rangsangan kolagen terhadap platelet. Agregasi platelet bersama dengan eritrosit akan menutup kapiler untuk menghambat pendarahan.

Selanjutnya, sel yang mengalami kerusakan akan mengeluarkan sitokin proinflamasi yang berfungsi sebagai faktor kemotaktik dari sel radang seperti sel polimorfonuklear, makrofag, dan limfosit yang bergerak menuju area luka. Makrofag akan menghasilkan sitokin *growth factor*, salah satunya berupa VEGF yang memiliki peran untuk memicu pembentukan sel endotel pada fase selanjutnya yaitu fase proliferasi.

Fase proliferasi ditandai dengan mulai terbentuk jaringan granulasi pada luka yang terdiri dari jaringan kapiler baru (angiogenesis), dan fibroblas. Pada fase proliferasi terjadi proses angiogenesis difasilitasi oleh sel endotel. PDGF, EGF, dan FGF merupakan faktor pertumbuhan

yang berasal dari trombosit dan makrofag berfungsi untuk memberikan sinyal pada sel endotel bermigrasi pada area sekitar luka.

Setelah itu, epitelisasi di tandai dengan replikasi dan migrasi sel epitel di tepi kulit (Prasetyono, 2009). Tahap akhir dari penyembuhan luka adalah fase maturasi atau *remodelling*. Pada tahap ini warna kemerahan dari jaringan mulai berkurang karena pembuluh darah mulai regres dan serat fibrin dari kolagen bertambah banyak untuk memperkuat bentuknya jaringan ikat untuk kemudian terjadi penutupan luka.

Salep kitosan yang diaplikasikan ke daerah luka bersifat sebagai hemostat yang dapat mempercepat penghentian pendarahan yang menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah. Ketika terjadi fase inflamasi maka makrofag akan merespond dengan menghasilkan sitokin *growth factors* salah satunya berupa VEGF yang akan menstimulus produksi sel endotel. Kitosan juga memiliki fungsi sebagai bakterostatik, dan anti inflamasi sehingga dapat mempersingkat waktu terjadinya inflamasi serta dapat meningkatkan makrofag saat terjadinya inflamasi. Selain itu kitosan mampu menstimulasi sel fibroblas, membantu deposisi kolagen, serta meningkatkan sintesis asam *hyaluronical* di lokasi luka sehingga mempercepat pembentukan jaringan granulasi dan berperan pada pembentukan jaringan ikat. Kitosan juga dapat membantu dalam sekresi enzim *kolagenase* yang dapat memecah kolagen muda yang terbentuk pada fase proliferasi menjadi kolagen

yang

lebih matang sehingga kekuatan dan struktur jaringan dapat menjadi lebih kuat dan proses penyembuhan luka dapat terjadi lebih cepat.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini, yaitu :

1. Tidak terdapat perbedaan nyata antara Salep ekstrak kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan ekstrak plasenta dan neomycin sulfat terhadap makrofag yang mengekspresikan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan terdapat perbedaan signifikan terhadap perlakuan haripada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi luka bakar.
2. Terapi Salep ekstrak kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) memiliki pengaruh yang sama dengan kontrol ekstrak plasenta dan Neomycin sulfat dalam memperbaiki histopatologi kulit pada perlakuan haritikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi luka bakar.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret sampai April 2018 dan dilakukan di beberapa laboratorium, yaitu :

1. Pemeliharaan hewan coba, pemberian perlakuan hewan coba, pembuatan preparat imunohistokimia dan pengamatan untuk ekspresi VEGF di Laboratorium Biokimia FK UB Malang.
2. Pembuatan ekstrak kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) di Laboratorium Sintesis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.
3. Pembuatan preparat histopatologi kulit dan pengamatan untuk jumlah pembuluh darah dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UB Malang.

4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, yaitu kandang tikus, spuit 1 mL, *glove*, masker, spidol, alat cukur, *stereofom*, kassa steril, timbangan, *water bath*, wadah air mendidih, *stopwatch*, pinset anatomis, alat penumbuk, *mortar* dan ayakan, pot organ, silet.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah kulit rajungan, alkohol 70%, air mendidih suhu 100°C, normal saline 0,9%, obat anastesi (*ketamine-xylazine*), *vaseline album*, Ekstrak placenta dan neomycin sulfat, dan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar umur 2-3 bulan dengan berat 150g. Alat dan bahan untuk pembuatan preparat imunohistokimia dan histopatologi.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
2. Prosedur ekstraksi kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicu*).
3. Pembuatan Salep ekstrak kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*).
4. Perlakuan luka bakar derajat II dalam pada hewan coba dengan menggunakan air mendidih 100°C dan plat besi.
5. Terapi salep ekstrak kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*).
6. Perhitungan ekspresi VEGF pada preparat histopatologi kulit dengan pewarnaan imunohistokimia.
7. Pengamatan pada preparat histopatologi kulit hewan coba.
8. Analisis data.

4.3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAKF) dan merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan *post control design only*. Tiap kelompok terdiri dari beberapa kelompok perlakuan tikus. Kelompok perlakuan pada penelitian yaitu:

- 1) Kelompok 1 adalah induksi luka bakar dengan pemberian salep Ekstrak placenta dan neomycin sulfat hari ke-1.

- 2) Kelompok 2 adalah induksi luka bakar dengan pemberian salep ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) 5% hari ke-1.
- 3) Kelompok 3 adalah induksi luka bakar dengan pemberian salep Ekstrak placenta dan neomycin sulfathari ke-3.
- 4) Kelompok 4 adalah induksi luka bakar dengan pemberian salep ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) 5% hari ke-3.
- 5) Kelompok 4 adalah induksi luka bakar dengan pemberian salep Ekstrak placenta dan neomycin sulfathari ke-7.
- 6) Kelompok 5 adalah induksi luka bakar dengan pemberian salep ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) 5% hari ke-7.

4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria hewan model yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan dengan berat ≤ 150 g, berumur 2 -3 bulan. Masing-masing tikus dipelihara dalam kandang yang sama di ruangan yang sama, serta diberi makanan dalam jumlah dan jenis yang sama. Besar sampel (n) untuk data berpasangan diperoleh dari rumus Federer (Tanggo, 2013) sebagai berikut :

$$(r-1)(t-1) \geq 15$$

$$(r-1)(6-1) \geq 15$$

$$(r-1)5 \geq 15$$

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Keterangan : r : replikasi

t : jumlah pengamatan atau intervensi

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 6 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok perlakuan, sehingga jumlah tikus yang dibutuhkan adalah 24 tikus.

4.3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- a. Variabel bebas : Salep ekstrak kitosan kulit rajungan 5% (*Portunus pelagicus*) dan salep Ekstrak placenta dan neomycin sulfat
- b. Variabel terikat : Ekspresi VEGF dan histopatologi kulit
- c. Variabel kontrol : Homogenitas tikus meliputi jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, dan kandang serta pelakuan luka bakar.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan dengan berat ≤ 150 g berumur 2-3 bulan. Tikus diadaptasi selama 7 hari sebelum digunakan untuk penelitian dan dikandangkan secara individu. Pemeliharaan pada hewan coba tersebut pakan diberikan berbentuk pelet sebanyak 10% berat badan setiap pagi dan sore dengan pemberian minum secara *ad libitum*. Tikus kemudian dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok 4 ekor

didalam kandang secara individu. Kandang tikus berbahan plastik dibagi menjadi 4 bagian menggunakan sekat dan dilengkapi tutup kandang berupa kawat ram. Bagian alas kandang diberi sekam kayu agar kandang tidak lembap (Muliani, 2011). Pemeliharaan tikus dilakukan di Laboratorium Biokimia FK UB Malang.

4.4.2 Prosedur Ekstraksi Kitosan Cangkang Rajungan

Bahan baku berupa cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) didapatkan dari *home industry* di daerah Sampang, Madura. Cangkang rajungan yang digunakan dibersihkan dari daging rajungan, kotoran, dan bagian-bagian tubuh rajungan yang masih melekat menggunakan air kran dan dibilas menggunakan aquades. Kemudian cangkang tersebut dikeringkan dibawah cahaya matahari langsung sampai kering. Setelah cangkang kering dihaluskan dengan cara ditumbuk dan diayak menggunakan ayakan ketebalan 50 mesh. Selanjutnya dilakukan ekstraksi kitosan yang terdiri dari tahapan deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilisasi.

a. Deproteinasi

Serbuk cangkang rajungan yang telah diayak sebanyak 400 g direaksikan dengan 3000 mL NaOH 1 M dan dihomogenkan menggunakan magnetik *stirrer* pada suhu 80 °C selama 1 jam. Kemudian padatan disaring dan residu tersebut dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 80°C hingga kering \pm 3 jam (Hastuti dan Tulus, 2015).

b. Demineralisasi

Serbuk hasil deproteinisasi sebanyak 200 g ditambah dengan 2000 mL HCL 1 M dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* selama 60 menit pada suhu kamar. Kemudian endapan disaring dan residu dicuci dengan akuades pH netral. Kemudian residu tersebut dikeringkan kembali dengan menggunakan oven bersuhu 80°C selama 3 jam. Hasil endapan ini disebut dengan kittin (Hastuti dan Tulus, 2015).

c. Deasetilisasi

Kittin yang telah dihasilkan dari proses demineralisasi berupa serbuk sebanyak 40 g ditambah dengan 250 NaOH 50%, kemudian direfluks didalam labu alas bulat selama 8 jam pada suhu 100°C. Hasil refluks kemudian didinginkan, disaring, lalu dicuci dengan *aquades* sampai pH netral. Kemudian endapan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 80°C selama 3 jam dan endapan yang telah kering diletakkan dalam desikator selama 24 jam. Endapan inilah yang dinamakan kitosan (Hastuti dan Tulus, 2015). Hasil akhir dari pembuatan ekstraksi berupa serbuk.

4.4.3 Pembuatan Salep Kitosan Cangkang Rajungan

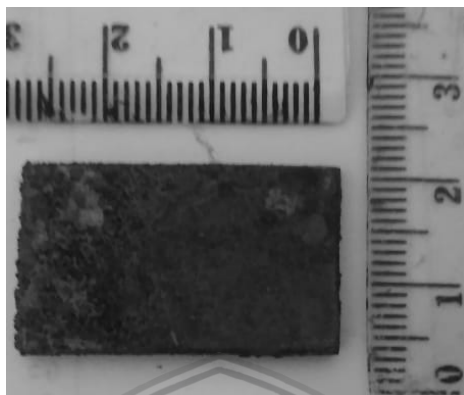
Pembuatan salep kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) menggunakan dasar salep hidrokarbon bahan *vaselin album*. *Vaselin album* memiliki kemampuan menghidrasi kulit sehingga dapat meningkatkan absorpsi zat aktif kitosan pada kulit (Naibaho dkk., 2013). Pembuatan dilakukan menggunakan *mortar* dengan mencampurkan *vaselin album* dan

kitosan dengan konsentrasi 5% sebanyak 22 g. Kemudian salep kitosan disimpan dalam *tube* dilengkapi dengan label.

4.4.4 Pembuatan Luka Bakar pada Tikus

Langkah-langkah yang dilakukan untuk pembuatan luka bakar pada hewan coba adalah sebagai berikut (Akhoondinasab *et al.*, 2014 dengan modifikasi):

- 1) Luka bakar ditentukan pada bagian sekitar punggung (*musculus obliquus*) tikus.
- 2) Rambut dibersihkan dan dicukur area yang akan dibuat luka bakar.
- 3) Tangan dicuci dan dipakaikan sarung tangan steril
- 4) Area kulit yang akan dibuat luka bakar dilakukan desinfeksi dengan alkohol 70% dan ditunggu hingga kering.
- 5) Anastesidilakukan menggunakan *ketamine-xylazine* dan tunggu 10-15 menit untuk membuat luka bakar (**lampiran 6**).
- 6) Lempeng logam berukuran 25 x 20 x 2 mm (**gambar 4.1**) dicelupkan dengan air panas (suhu 100°C) selama 15 menit.
- 7) Lempeng logam dipegang dengan menggunakan pinset dan ditempelkan tanpa penekanan pada hewan coba selama 15 detik.
- 8) Lempeng logam diangkat lalu kulit dikompres dengan normal saline selama 1 menit untuk mencegah perluasan luka di jaringan sekitar.
- 9) Area luka diberikan perawatan sesuai dengan prosedur rawat luka.



Gambar 4.1 Lempeng Logam yang digunakan untuk menginduksi luka bakar.

4.4.5 Terapi Salep Kitosan Cangkang Rajungan

Salep dibuat sebanyak 22 g pada konsentrasi 5%. Salep diberikan pada area luka dengan frekuensi pemberian 2 kali sehari. Perhitungan dosis bisa dilihat pada **Lampiran 5**.

4.4.6 Pembuatan Preparat Histologi Kulit

Sebelum membuat preparat histologi jaringan kulit dilakukan euthanasi terlebih dahulu pada hewan coba dengan caradislokasi leher (AVMA, 2013). Setelah itu dilakukan pengambilan jaringan kulit. Kulit digunting dengan ketebalan ± 4 mm sampai dengan subkutan dan panjang 2,5 cm. Bagian kulit luka diisolasi dan dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9%. Kulit yang diperoleh kemudian dipotong menjadi dua bagian. Lalu bagian yang ingin digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dimasukkan ke dalam pot dan difiksasi dengan larutan *Buffer Natural Formaline* (BNF) dan dibiarkan pada suhu kamar selama 48 jam (Febram dkk., 2010).

Sediaan kulit yang telah difiksasi menggunakan BNF 10% dilakukan

tissue trimming jaringan dan dimasukkan ke dalam *casette tissue* dari plastik. Kemudian dilakukan proses dehidrasi alkohol menggunakan konsentrasi alkohol bertingkat yaitu 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I, alkohol absolut II masing-masing selama 2 jam. Setelah itu dilakukan penjernihan menggunakan *xylol* I dan *xylol* II masing-masing selama 2 jam. Proses pencetakan atau parafinisasi menggunakan parafin I dan parafin II. Sediaan dimasukkan ke dalam cetakan yang berisi parafin setengah volume dan potongan melintang sediaan melekat pada dasar parafin. Setelah mulai membeku maka parafin ditambahkan lagi dalam pencetak hingga penuh dan dibiarkan mengeras. Setelah blok parafin mengeras dilakukan pemotongan setebal 5 mikrometer menggunakan mikrotom. Hasil potongan yang berbentuk pita (*ribbon*) tersebut dibentangkan diatas air hangat yang bersuhu 46°C dan langsung diangkat untuk meregangkan potongan agar menghilangkan lipatan akibat dari pemotongan. Sediaan tersebut kemudian diangkat dan diletakkan diatas gelas objek dan dikeringkan semalaman dalam inkubator bersuhu 60°C untuk dilakukan pewarnaan Hematoksilen-Eosin (HE) (Febram dkk., 2010).

4.4.7 Pengamatan Histopatologi Kulit

Pengamatan dilakukan pada daerah epidermis dan dermis kulit pada sel fibroblast, sel epitel, sel radang, pembuluh darah dan folikel rambut pada perbesaran 100x dan 400X tiap lapang pandang pada mikroskop OLYMPUS E seri XC® 10 yang dilengkapi software OlyVia® (*Viewer for Imaging Application*)

4.4.8 Prosedur Imunohistokimia Ekspresi VEGF

Imunohistokimia (IHK) merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menentukan keberadaan protein target dalam jaringan atau sel dengan memanfaatkan prinsip antara protein target (antigen) dan antibodi. Teknik ini diawali dengan pembuatan preparat histologi agar dapat diamati di bawah mikroskop. Preparat jaringan yang telah didapat selanjutnya memasuki prosedur IHK. Prosedur IHK menggunakan antibodi yang dilabeli enzim sehingga ikatan protein dan antibodi dapat divisualisasikan. Enzim selanjutnya direaksikan dengan substrat kromogen yang dapat diamati dengan mikroskop cahaya (Fatchiyah dkk., 2009).

Tahapan pewarnaan imunohistokimia diawali dengan perendaman slide pada *xylol* I, *xylol* II, dan alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%). Slide preparat kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 1x15 menit. Selanjutnya ditetesi dengan H_2O_2 selama 20 menit. Setelah itu di cuci kembali dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan 5% FBS selama 1 jam. Kemudian, slide preparat dicuci kembali selama 5 menit sebanyak 3 kali dan selanjutnya diinkubasi dengan antibodi *primer mouse anti rat VEGF* (VG-1) selama 1 jam dengan suhu ruang dan dilakukan pencucian kembali menggunakan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Berikutnya, di inkubasi dengan antibodi sekunder selama 1 jam dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali.

Slide preparat ditetesi dengan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit. Diamano *Benzidine* (DAB)

ditestkan selama 10 menit. Kembali dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit. Slide di cuci dengan air mengalir. Slide dibilas dengan aquades dan dikeringkan, lalu slide dimounting dengan etellan dan ditutup dengan *cover glass*.

Pengamatan dilakukan pada daerah dermis kulit pada sel makrofag. Sel yang mengekspresikan VEGF adalah sel berwarna coklat yang terakumulasi pada sitoplasma sel makrofag. Ekspresi VEGF dihitung dengan banyaknya sitoplasma yang tercat positif (coklat) di sekitar sel makrofag pada lima lapang pandang dengan perbesaran 400X tiap lapang pandang pada mikroskop OLYMPUS E seri XC® 10 yang dilengkapi software OlyVia® (*Viewer for Imaging Application*) .

4.4.9 Analisa Data

Data yang diperoleh dalam penelitian berupa data kualitatif dengan melihat histopatologi kulit dan data kuantitatif untuk menganalisis ekspresi VEGF dengan uji ANOVA faktorial (*general linear model*) untuk mengetahui pengaruh perlakuan kelompok. Jika terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji *Tukey* dengan tingkat kepercayaan 95%.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Terapi Salep Ekstrak Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) terhadap Luka Bakar Pada Tikus Putih Berdasarkan Gambaran Makroskopis

Gambaran makroskopis luka bakar (**Gambar 5.1**) pada penelitian ini, sebelum diberikan terapi menunjukkan kondisi jaringan terlihat lebih putih kemerahan dibandingkan warna jaringan sehat disekitarnya dan tidak terdapat bulla. Warna dan tidak ada bulla tersebut merupakan indikasi klinis luka bakar derajat II dalam (Kliegman, *et al.*, 2011).



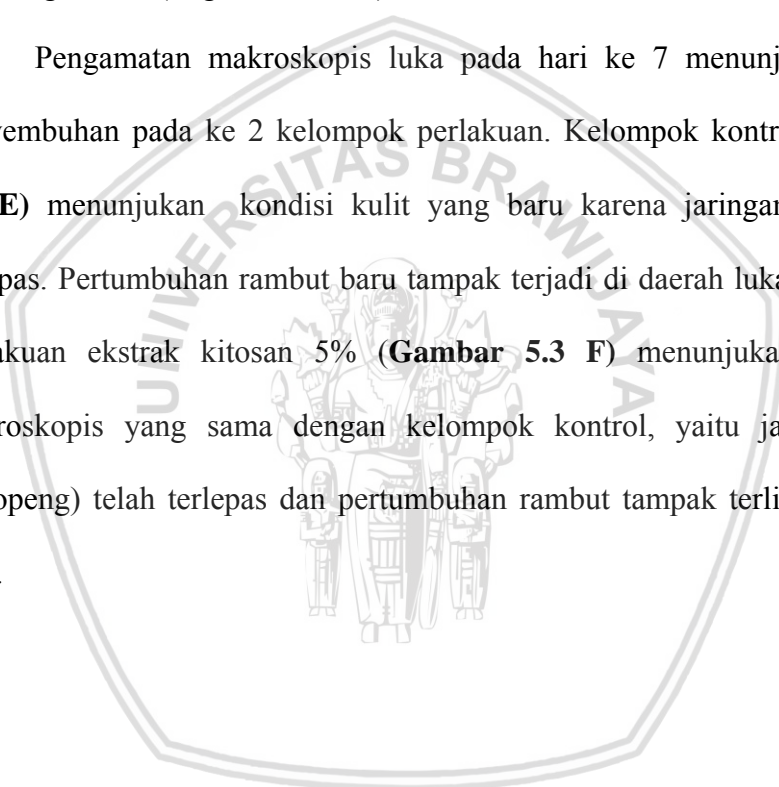
Gambar 5.1. Gambaran makroskopis luka bakar sebelum diterapi

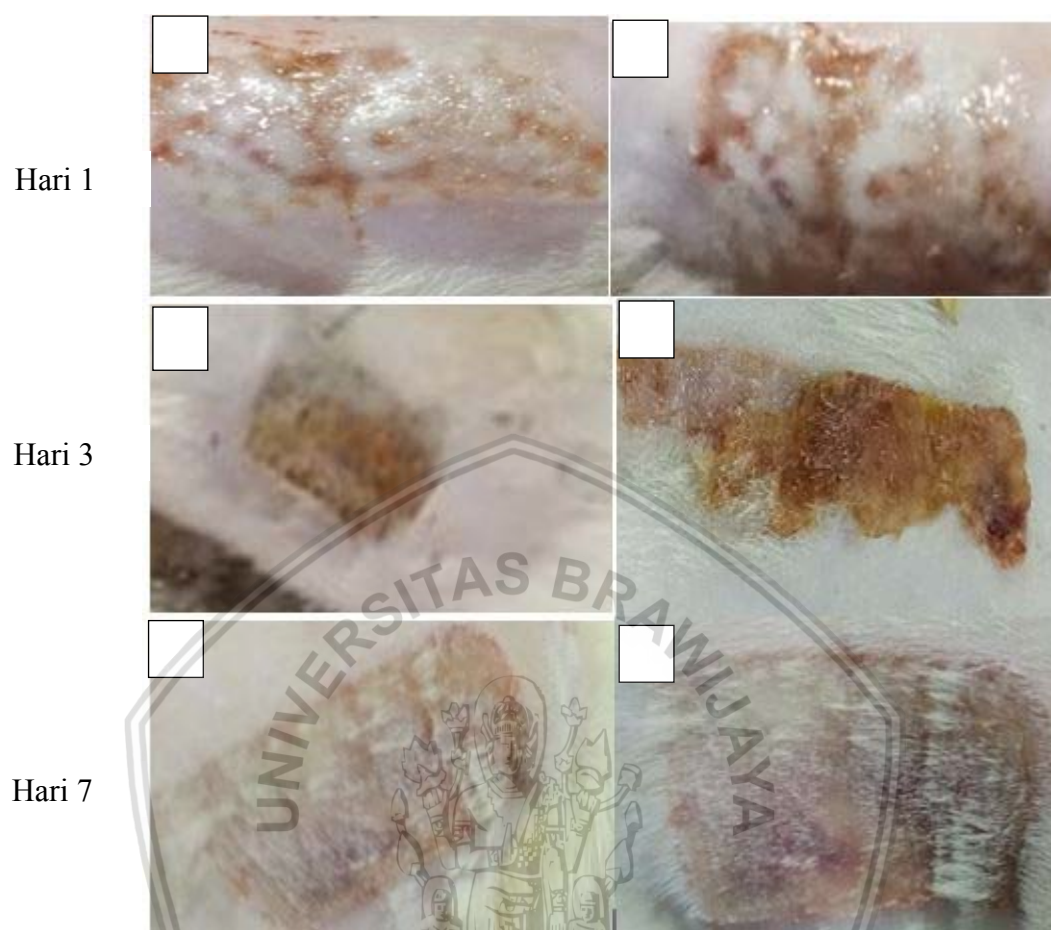
Pengamatan makroskopis luka bakar setelah diterapi hari ke 1 menunjukkan sudah mulai terjadinya inflamasi. Kelompok kontrol (**Gambar 5.2 A**) maupun perlakuan (**gambar 5.2 B**) menunjukkan adanya kematian jaringan, tidak terlihat adanya pengecilan ukuran luka.

Pengamatan luka bakar setelah diterapi hingga hari ke 3 menunjukkan proses penyembuhan luka pada ke 2 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol (**Gambar 5.2 C**) menunjukkan terjadinya pembentukan keropeng yang mulai mengering walaupun belum sepenuhnya. Pada kelompok

perlakuan kitosan 5% (**Gambar 5.2 D**) menunjukkan terjadinya pembentukan keropeng yang sudah kering. Terbentuknya keropeng merupakan fase awal proliferasi pada proses penyembuhan luka. Keropeng terbentuk karena denaturasi protein pada lapisan kulit. Keropeng (*Scab*) yang terbentuk diatas permukaan luka membantu hemostasis dan mencegah kontaminasi luka oleh mikroorganisme (Argamula, 2008).

Pengamatan makroskopis luka pada hari ke 7 menunjukkan proses penyembuhan pada ke 2 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol (**Gambar 5.3 E**) menunjukkan kondisi kulit yang baru karena jaringan mati telah terlepas. Pertumbuhan rambut baru tampak terjadi di daerah luka. Kelompok perlakuan ekstrak kitosan 5% (**Gambar 5.3 F**) menunjukkan gambaran makroskopis yang sama dengan kelompok kontrol, yaitu jaringan mati (keropeng) telah terlepas dan pertumbuhan rambut tampak terlihat disekitar luka.



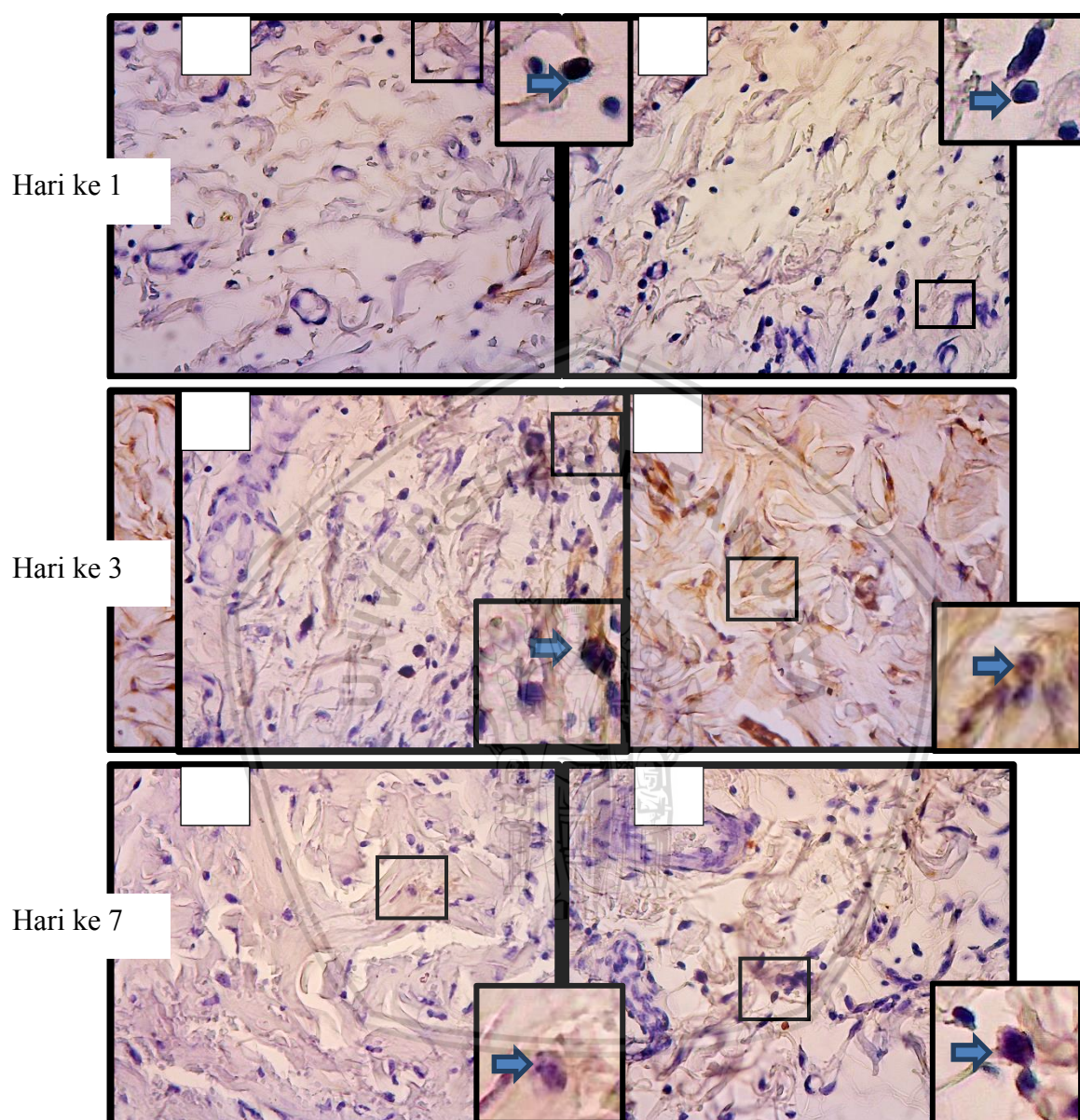


Gambar 5.2. Gambaran Makroskopis Luka Bakar :

- A. Kontrol hari ke 1 (ekstrak plasenta dan *Neomycin sulfat*)
- B. Perlakuan ekstrak kitosan 5%, hari ke 1
- C. Kontrol hari ke 3 (ekstrak plasenta dan *Neomycin sulfat*)
- D. Perlakuan ekstrak kitosan 5%, hari ke 3
- E. Kontrol hari ke 7 (ekstrak plasenta dan *Neomycin sulfat*)
- F. Perlakuan ekstrak kitosan 5%, hari ke 7

5.2 Pengaruh Terapi Salep Ekstrak Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) terhadap Luka Bakar Pada Tikus Putih Berdasarkan Jumlah VEGF pada Kulit

Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF) merupakan faktor yang berperan dalam proses proliferasi sel endotel dalam penyembuhan luka. Menurut Destri (2017) faktor pertumbuhan VEGF diproduksi oleh makrofag dan endotel untuk menginduksi terjadinya angiogenesis. Penelitian ini menghitung sel makrofag yang mengekspresikan VEGF, agar mendapatkan hasil yang seragam dan lebih maksimal, dikarenakan pada hari ke-1 setelah luka adalah fase inflamasi sehingga sel endotel belum aktif berproliferasi. Sel endotel baru akan berproliferasi dan menghasilkan VEGF pada fase proliferasi sehingga dikhawatirkan jika VEGF belum terekspresi pada sel endotel. Makrofag mempunyai jumlah yang relatif sama pada fase inflamasi sampai fase proliferasi karena pada fase inflamasi makrofag mempunyai peranan fagositosis, serta melepaskan beberapa sitokin proinflamasi, *antigen processing* dan *antigen presenting cells* (APC) dan pada fase proliferasi makrofag juga memiliki peranan penting dalam merangsang ekspresi berbagai faktor pertumbuhan (Hosgood, 2009).



Gambar 5.3. Gambaran Mikroskopis Ekspresi VEGF Luka Bakar :

- A. Kontrol hari ke 1 (ekstrak plasenta dan *Neomycin sulfat*)
- B. Perlakuan ekstrak kitosan 5%, hari ke 1
- C. Kontrol hari ke 3 (ekstrak plasenta dan *Neomycin sulfat*)
- D. Perlakuan ekstrak kitosan 5%, hari ke 3
- E. Kontrol hari ke 7 (ekstrak plasenta dan *Neomycin sulfat*)
- F. Perlakuan ekstrak kitosan 5%, hari ke 7

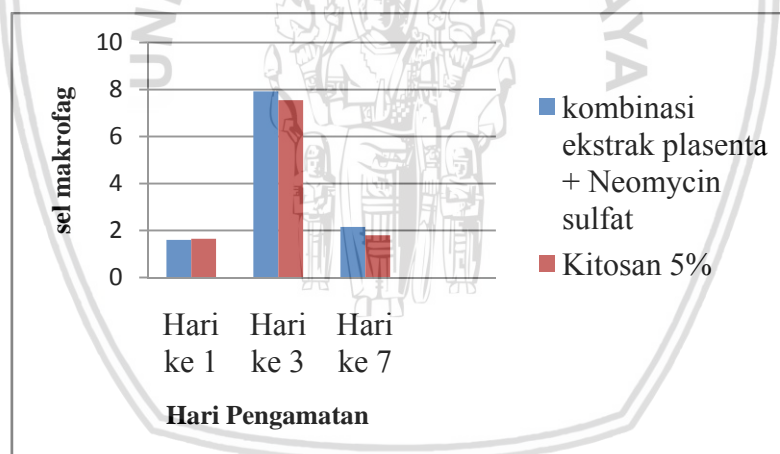
Ekspresi VEGF ditunjukkan oleh sel makrofag yang berwarna coklat dan ungu kehitaman pada bagian dermis jaringan kulit. Warna coklat yang muncul disebabkan oleh ikatan antara antigen pada jaringan dan antibodi yang diberikan. Antibodi primer akan berikatan dengan antigen pada jaringan dan antibodi sekunder yang diikuti dengan penambahan enzim *Strepta Avidin Horseradish Peroxidase*(SA-HRP) dan substrat berupa kromagen DAB sehingga menghasilkan warna kecoklatan pada target yang spesifik. Hasil perhitungan makrofag dilakukan dengan metode histopatologi dengan pewarnaan IHC. Makrofag memiliki karakteristik bentuk sel tidak beraturan dan cabang-cabangnya pendek, inti berbentuk lonjong, kadang-kadang berlekuk, lebih kecil dari inti fibroblast (**Gambar 5.3**).

Hasil uji ANOVA faktorial(*general linear model*) menunjukkan ekspresi VEGF kelompok kontrol kombinasi ekstrak plasenta dan Neomycin sulfat dan kelompok perlakuan kitosan 5% tidak berbeda nyata ($p>0,05$). Pada perlakuan hari ekspresi VEGF pada kelompok kontrol (kombinasi ekstrak plasenta dan Neomycin sulfat) dan kelompok perlakuan kitosan 5% berbeda nyata ($p<0,05$). Selanjutnya, uji *Tukey* dengan taraf kepercayaan 95% dilakukan pada perlakuan hari.

Tabel 5.1 Data Jumlah Makrofag yang Mengekspresikan VEGF

Kelompok	Rata – rata Makrofag yang mengekspresikan VEGF (mean \pm SD)	Penurunan Peningkatan VEGF (%) terhadap hari	dan Ekspresi terhadap
Kontrol (ekstrak plasenta dan <i>Neomycin sulfat</i>)			
Hari ke 1	1.60 \pm 0.16 ^a	-	
Hari ke 3	7.92 \pm 1.12 ^b	79.7%	
Hari ke 7	2.15 \pm 0.19 ^a	72.8%	
Kitosan 5%			
Hari ke 1	1.65 \pm 0.25 ^a	-	
Hari ke 3	7.55 \pm 1.11 ^b	78.1%	
Hari ke 7	1.80 \pm 0.34 ^a	76.1%	

Keterangan : Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antar kelompok perlakuan



Gambar 5.4 Diagram Perbandingan rata-rata jumlah makrofag yang mengekspresikan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

Pada penelitian ini kelompok perlakuan kitosan 5% hari ke 1 menunjukkan jumlah makrofag yang terekspresi VEGF (1.65 ± 0.25) sel menunjukkan rata-rata terkecil dan berbeda signifikan ($P < 0,05$) dari perlakuan kitosan 5% hari ke 3 (7.55 ± 1.11) sel (**Tabel 5.1**). Pada hari ke 1 jumlah

ekspresi VEGF masih rendah karena proses kesembuhan luka masih dalam fase inflamasi. Pada fase inflamasi yang lebih berperan adalah neutrofil yang berfungsi membuang jaringan mati dan bakteri dengan cara fagositosis, neutrofil akan difagositosis oleh makrofag atau mati. Makrofag penting untuk membuang material asing dan merangsang pergerakan sel. Makrofag pada fase inflamasi lebih banyak menghasilkan sitokin seperti IL- 1 dan TNF- α (Leong, 2012).

Berdasarkan **Tabel 5.1** dan **gambar 5.4** diatas, rata-rata jumlah makrofag yang mengekspresikan VEGF pada hari ke 3 mengalami peningkatan signifikan ($P < 0,05$) sebesar 79.7% dibanding dengan hari ke 1. Tingginya jumlah makrofag yang mengekspresikan VEGF menunjukkan bahwa tahapan inflamasi sudah mulai berakhir dan mulai memasuki tahap awal proliferasi. Hal tersebut didukung oleh pendapat Eming *et al.* (2007) bahwa VEGF akan mulai diproduksi oleh makrofag pada fase awal proliferasi yang berfungsi untuk memfasilitasi terjadinya angiogenesis dengan menstimuli proliferasi dan migrasi sel endotel untuk membentuk pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang ada. Kandungan glukosamin pada kitosan berperan penting dalam modulasi angiogenesis. Hal ini sangat penting dalam ikatan antara faktor angiogenik dengan reseptor-reseptornya. Pembentukan pembuluh darah baru pada penyembuhan luka sangat perlu untuk mendukung jaringan granulasi yang baru (Kim, 2004).

Pada kelompok perlakuan kitosan 5% hari ke 7 menunjukkan jumlah makrofag yang terekspresi VEGF sebesar (1.8 ± 0.34) sel terjadi

penurunan signifikan ($P < 0,05$) sebesar 72,8% dibandingkan dengan hari ke 3 (**Gambar 5.3**). Hal ini menunjukkan bahwa kelompok perlakuan kitosan 5% mampu mempercepat proses penyembuhan yang diindikasikan secara teori bahwa pada pembentukan pembuluh darah yang telah matang ditandai dengan menghilangnya sinyal VEGF di daerah luka. Menurunnya jumlah makrofag yang terekspresi VEGF menandakan bahwa perlakuan salep kitosan mampu mempercepat penyembuhan luka. Pada saat luka membentuk jaringan granulasi maka angiogenesis akan berhenti, pembentukan pembuluh darah berkurang dan sel endotel mengalami apoptosis (Reinke, 2013).

Ekspresi VEGF pada setiap kelompok perlakuan berdasarkan uji ANOVA faktorial (*general linear model*) pada perlakuan salep tidak terdapat perbedaan signifikan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa salep ekstrak kitosan cangkang rajungan dapat menyembuhkan luka bakar derajat II sama baiknya dengan kombinasi salep ekstrak plasenta dan *Neomycin sulfat* yang merupakan *gold standard* obat penyembuhan luka bakar. Penelitian ini membuktikan bahwa salep ekstrak kitosan 5% efektif dalam membantu proses kesembuhan luka bakar.

Ekstrak plasenta mengandung *polydeoxyribonucleotides* molekul DNA dengan berat molekul rendah yang ada secara alami didalam tubuh untuk mempercepat penyembuhan luka dengan cara meningkatkan faktor pertumbuhan beta (TGF- β) pada awal fase penyembuhan luka dan peningkatan faktor pertumbuhan endotel (VEGF) pada fase proliferasi (Gupta *et al.*, 2016). Sama halnya dengan ekstrak plasenta, kitosan juga

meningkatkan faktor pertumbuhan. Sifat biologis kitosan termasuk biodegradasi menyebabkan kitosan oleh enzim lisozim akan dipecah N-acetil-d-glukosamin berbentuk dimer aktif dan membentuk *cross-linked* dengan glikosaminoglikan dan glikoprotein yang merupakan makromolekul matriks ekstraseluler serta menstimulasi peningkatan TGF-B1, FGF-2 dan VEGF (Sularsih, 2013).

Pada salep kontrol selain ekstrak plasenta juga terdapat Neomycin sulfat yang berfungsi sebagai antibakteri. Neomycin merupakan golongan aminoglikosida berspektrum luas peka terhadap gram negatif dan gram positif, bersifat bakteriosidal yang dapat membunuh bakteri. Neomycin akan berikatan dengan subunit 30s ribosom dan menghambat sintesis protein. Terikatnya Neomycin pada ribosom dapat mempercepat transport neomycin kedalam sel sehingga menyebabkan kerusakan pada membran sitoplasma yang selanjutnya menyebabkan kematian sel (Plumb, 2008).

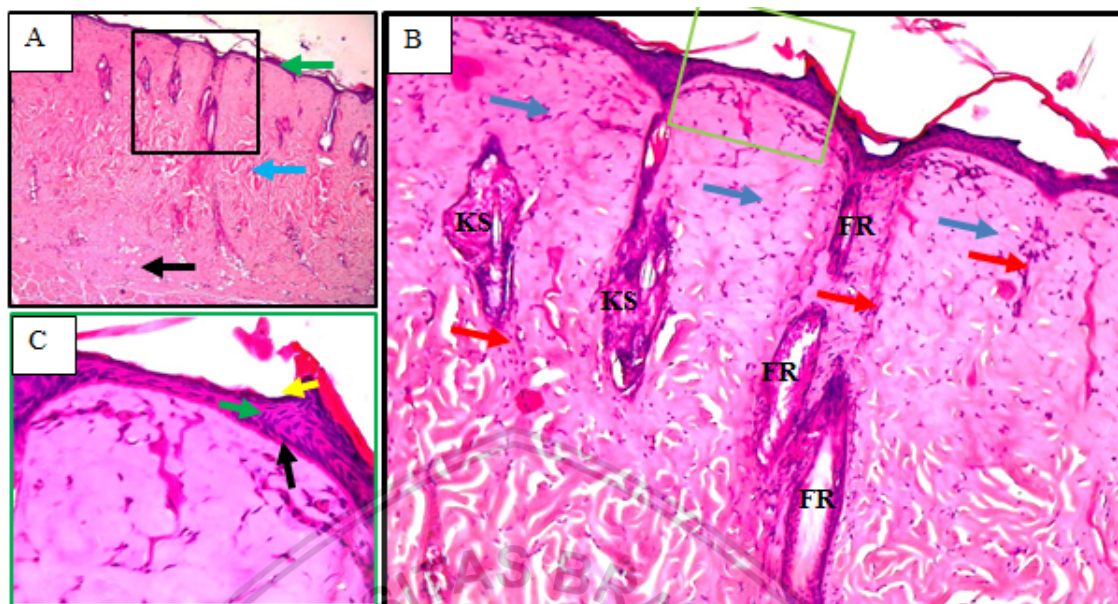
Selain meningkatkan faktor pertumbuhan, kitosan juga memiliki sifat anti bakteri yaitu dengan cara berikatan dengan lipid yang ada pada permukaan dinding sel bakteri. Menurut Yusman (2006), bakteri Gram positif memiliki kandungan peptidoglikan yang tinggi dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Kandungan peptidoglikan yang tinggi akan mengakibatkan tingginya kandungan lipid. Menurut Widodo *et al.* (2006), kitosan bersifat polikationik dapat mengikat lipid dan logam berat. Rusaknya lipid pada dinding sel bakteri akan mengakibatkan rusaknya pertahanan sel. Bakteri Gram positif memiliki asam teikoat, polimer yang bersifat asam yang

mengandung gliserol fosfat. Menurut Yusman (2006), asam teikoat dan mengandung ulangan rantai gliserol fosfat dan ribitol fosfat pada bakteri gram positif menyebabkan bakteri gram positif bermuatan negatif. Muatan negatif pada dinding sel bakteri akan berikatan dengan muatan positif dari kitosan sehingga membentuk senyawa yang tidak bermuatan.

5.3 Pengaruh Terapi Salep Ekstrak Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) terhadap Luka Bakar Pada Tikus Putih Berdasarkan Gambaran Histopatologi Kulit

Luka bakar derajat II menyebabkan kerusakan kulit sampai bagian dermis dan pembuluh darah. Kerusakan kulit pada luka bakar derajat II dalam ditandai dengan terjadinya nekrosis pada sebagian atau semua folikel rambut. Kerusakan pembuluh darah mengakibatkan permialitas meninggi sehingga cairan intravaskuler (protein plasma, elektrolit) keluar dari lumen pembuluh darah. Akibatnya cairan intravaskuler mengisi jaringan interstitial dan menyebabkan edema (Moenadjat, 2009).

Penyembuhan luka dibagi menjadi tiga fase yaitu inflamasi, proliferasi dan *remodeling* jaringan. Fase ini terjadi pada hari ke 1 sampai hari ke 3. Pada fase awal, terjadi hemostasis dimana pembuluh darah yang terputus pada luka akan dihentikan dengan terjadinya reaksi vasokonstriksi untuk memulihkan aliran darah serta inflamasi untuk membuang jaringan rusak dan mencegah infeksi bakteri (Leong, 2012).

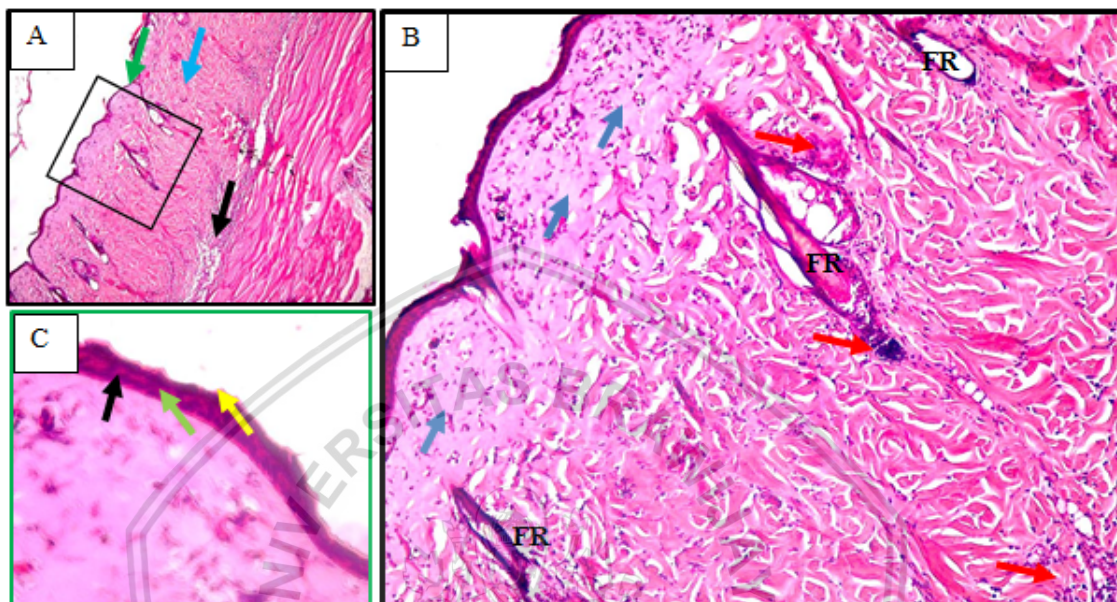


Gambar 5.5 Gambaran Histopatologi Kulit Pewarnaan HE Kelompok Tikus Model Luka Bakar Kelompok Kontrol (Ekstrak plasenta dan neomycin sulfat) perbesaran 40x (A), 100x (B) dan 400x (C) hari ke 1

Keterangan :A. Terlihat adanya epidermis, (→) dermis mengalami perubahan patologis (→) dan hipodermis (→) normal.
B. Adanya folikel rambut (FR), kelenjar sebacea (KS) yang mengalami nekrosis, infiltrasi sel radang (→) dan (→) edema di lapisan dermis
C. Lapisan epidermis menunjukkan stratum granulosum (→), stratum spinosum (→) dan stratum basale (→).

Gambaran histopatologi kulit kelompok kontrol (kombinasi ekstrak plasenta dan *Neomycin sulfat*) hari ke 1 (**Gambar 5.5**) menunjukkan kondisi kulit tikus yang menunjukkan luka bakar derajat II dalam yang ditandai dengan kerusakan lapisan epidermis hingga dermis (Edlich, 2015). Kerusakan pada lapisan dermis (**Gambar 5.5 B**) dilihat dari folikel rambut yang mengalami nekrosis, edema jaringan dermis dan terlihat adanya infiltrasi sel radang. Adanya sel radang yang terlihat karena adanya respons inflamasi pada jaringan yang mengalami luka. Sel radang dirangsang menuju luka sehingga masih banyak terdapat sel radang pada hari ke 1. Lapisan epidermis (**Gambar**

5.5 C) menunjukkan stratum spinosum, granulosum dan basal belum mengalami diferensiasi.



Gambar 5.6 Gambaran Histopatologi Kulit Pewarnaan HE Kelompok Tikus Model Luka Bakar Kelompok Perlakuan kitosan 5% perbesaran 40x (A), 100x (B) dan 400x (C) hari ke 1

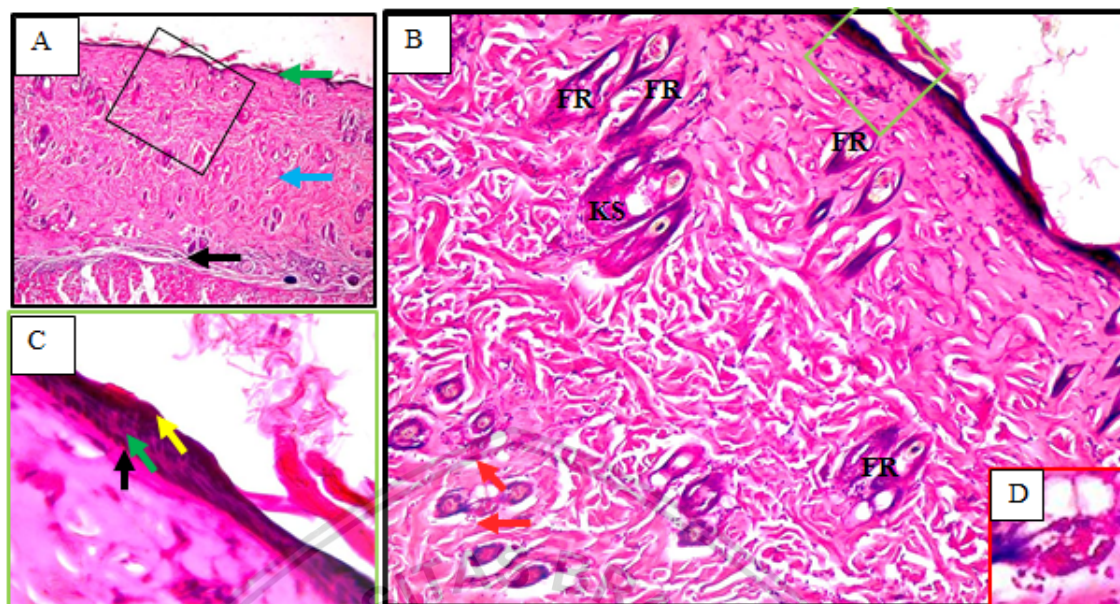
Keterangan : A. Terlihat adanya epidermis, (→) dermis mengalami perubahan patologis (→) dan hipodermis (→) normal.
 B. Adannya folikel rambut (FR), kelenjar sebacea (KS) yang mengalami nekrosis, infiltrasi sel radang (→) dan (→) edema di lapisan dermis
 C. Lapisan epidermis menunjukkan stratum granulosum (→), stratum spinosum (→) dan stratum basal (→).

Gambaran histopatologi kulit kelompok perlakuan kitosan 5% hari ke 1 (**Gambar 5.6**) menunjukkan kondisi yang sama seperti kontrol (Ekstrak plasenta dan neomycin sulfat). Kulit tikus yang menunjukkan luka bakar derajat II dalam yang ditandai dengan kerusakan lapisan epidermis hingga dermis (Edlich, 2015). Kerusakan pada lapisan dermis (**Gambar 5.6 B**) dilihat dari kelenjar sebacea yang mengalami nekrosis, jaringan dermis mengalami edema dan terlihat adanya infiltrasi sel radang. Adanya sel radang yang terlihat karena respons inflamasi pada jaringan yang mengalami luka. Sel

radang dirangsang menuju luka sehingga masih banyak terdapat sel radang pada hari ke 1. Lapisan epidermis (**Gambar 5.6 C**) menunjukkan stratum spinosum, granulosum dan basal belum mengalami diferensiasi.

Fase proliferasi umumnya berlangsung mulai hari ke 4 hingga hari ke 21 setelah luka terbentuk. Pada fase proliferasi terjadi penurunan sel – sel radang, munculnya sel fibroblast, pembentukan pembuluh darah baru, epitelialisasi dan kontraksi luka. Pada fase awal proliferasi terjadi pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis). Angiogenesis terjadi pada fase akhir inflamasi dan fase awal proliferasi. Angiogenesis terjadi karena kebutuhan energi yang tinggi untuk proliferasi sel. Selain itu angiogenesis juga diperlukan untuk mengatur vaskularisasi yang rusak (Gurtner, 2007).

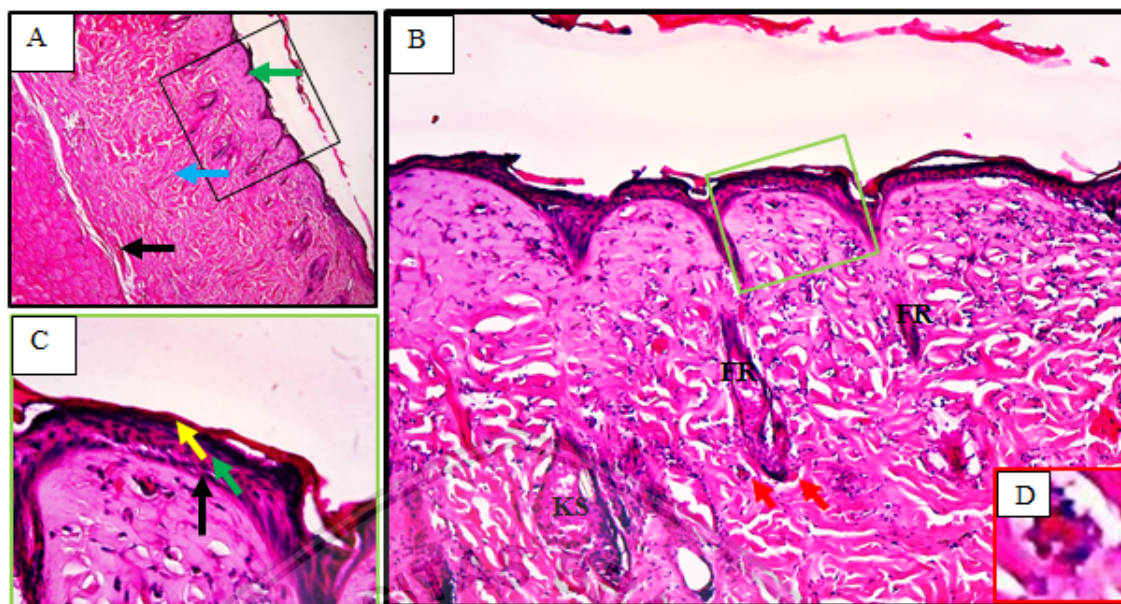
Gambaran histopatologi kulit kelompok kontrol (ekstrak plasenta dan *Neomycin sulfat*) hari ke 3 (**Gambar 5.7**) menunjukkan adanya pembentukan pembuluh darah baru, terlihat adanya pembentukan folikel rambut yang baru pada lapisan dermis (**Gambar 5.7 B**). Pada lapisan epidermis (**Gambar 5.7 C**) terlihat masih sama seperti hari ke 1.



Gambar 5.7 Gambaran Histopatologi Kulit Pewarnaan HE Kelompok Tikus Model Luka Bakar Kelompok Kontrol (Ekstrak plasenta dan neomycin sulfat) perbesaran 40x (A), 100x (B) dan 400x (C dan D) hari ke 3

- Keterangan :**
- A.** Terlihat adanya epidermis, (→) dermis mengalami perubahan patologis (→) dan hipodermis (→) normal
 - B.** Adanya pembuluh darah (→), folikel rambut (FR), dan kelenjar sebacea (KS) yang baru pada lapisan dermis
 - C.** Lapisan epidermis menunjukkan stratum granulosum (→) stratum spinosum (→) dan stratum basale (→)
 - D.** Adanya pembuluh darah pada lapisan dermis.

Gambaran histopatologi kulit kelompok perlakuan kitosan 5% hari ke 3 (**Gambar 5.8**) menunjukkan adanya pembentukan pembuluh darah baru, terlihat adanya pembentukan folikel rambut yang baru dan jaringan mulai memadat pada lapisan dermis (**Gambar 5.8 B**). Pada lapisan epidermis (**Gambar 5.8 C**) terlihat stratum spinosum, granulosum dan basal masih sama seperti hari ke 1.



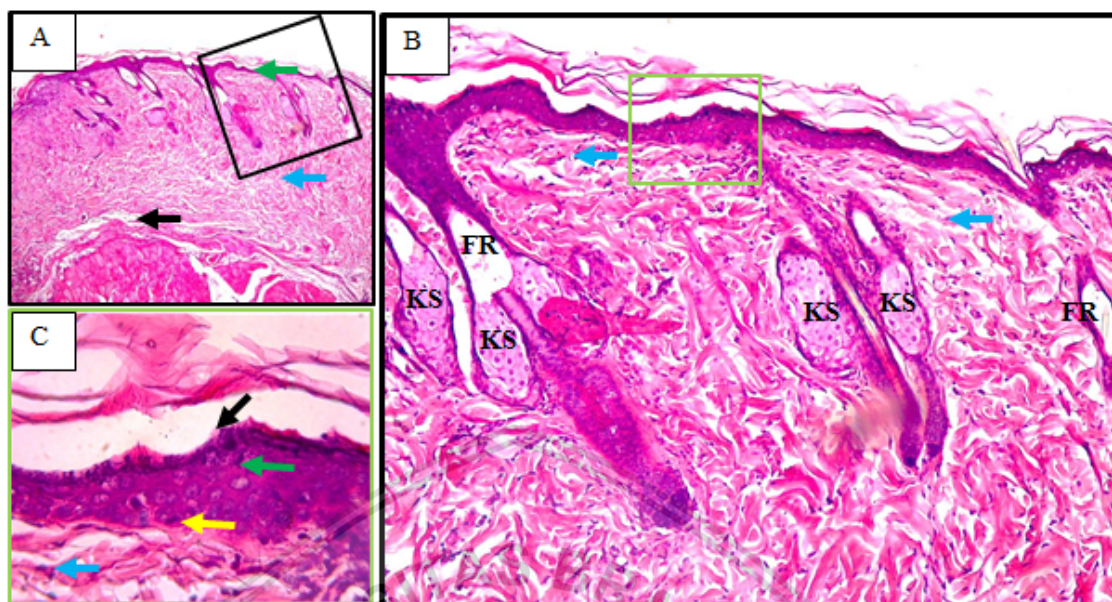
Gambar 5.8 Gambaran Histopatologi Kulit Pewarnaan HE Kelompok Tikus Model Luka Bakar Kelompok Perlakuan Kitosan 5% perbesaran 40x (A), 100x (B) dan 400x (C dan D) hari ke 3

- Keterangan :**
- A.** Terlihat adanya epidermis, (→) dermis mengalami perubahan patologis (→) dan hipodermis (→) normal.
 - B.** Adanya pembuluh darah (→), folikel rambut (FR), dan kelenjar sebacea (KS) yang baru pada lapisan dermis
 - C.** Lapisan epidermis menunjukkan stratum granulosum (→), stratum spinosum (→) dan stratum basal (→)
 - D.** Adanya pembuluh darah pada lapisan dermis.

Pada fase proliferasi matriks fibrin yang dipenuhi platelet dan makrofag mengeluarkan *growth factor* yang mengaktivasi fibroblast. Fibroblast bermigrasi ke daerah luka dan mulai berproliferasi hingga jumlahnya lebih dominan dari sel radang. Fungsi utama dari fibroblast adalah sintesis kolagen sebagai komponen *extracellular matrix* (ECM). Kolagen tersebut akan bertambah banyak dan menggantikan fibrin sebagai penyusun matriks utama pada luka (Schultz, 2007).

Pada fase ini terjadi pula epitelialisasi yaitu proses pembentukan kembali lapisan kulit yang rusak. Pada tepi luka, keratinosit akan berproliferasi setelah kontak dengan ECM dan kemudian bermigrasi dari membran basal ke permukaan yang baru terbentuk. Ketika bermigrasi, keratinosit akan menginisiasi sel dari matriks dermis dan membentuk pergerakan matriks awal. Keratinosit juga mensintesis Matriks Metaloproteinase(MMP) ketika bermigrasi (Schultz, 2007).

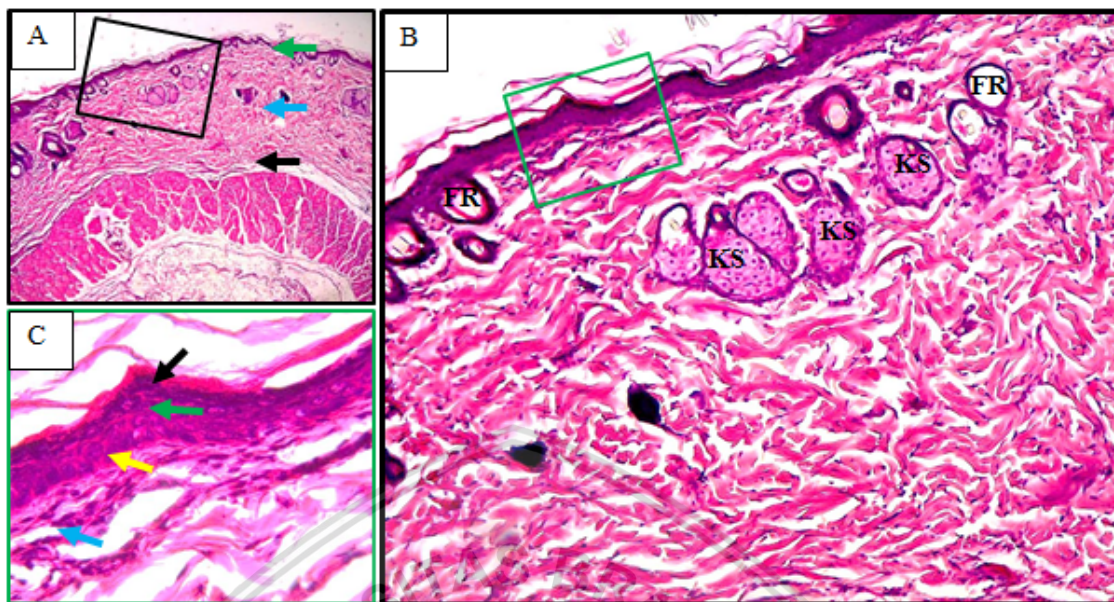
Gambaran histopatologi kulit kelompok kontrol (Ekstrak plasenta dan neomycin sulfat) hari ke 7 (**Gambar 5.9**) telah nampak banyaknya folikel dan kelenjar sebacea yang terbentuk, terbentuknya jaringan kolagen serta fibroblast yang menyebar pada lapisan dermis (**Gambar 5.9 A**).Lapisan epidermis (**Gambar 5.9 B**) menunjukkan pertumbuhan re-epitelialisasi yang sudah baik karena sudah terjadi penebalan dan terlihatnya semua lapisan epidermis yaitu stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum dan stratum basalis.



Gambar 5.9 Gambaran Histopatologi Kulit Pewarnaan HE Kelompok Tikus Model Luka Bakar Kelompok Kontrol (Ekstrak plasenta dan Neomycin sulfat) perbesaran 40x (A), 100x (B) dan 400x (C) hari ke 7.

- Keterangan :**
- A. Terlihat adanya epidermis (→), dermis (→) dan hipodermis (→) normal.
 - B. Adanya folikel rambut (FR), kelenjar sebacea (KS) dan jaringan ikat (→) yang baru pada lapisan dermis.
 - C. Lapisan epidermis menunjukkan stratum granulosum (→), stratum spinosum (→), stratum basale (→) di lapisan epidermis dan sel fibroblast (→) di lapisan dermis.

Gambaran histopatologi kulit kelompok kontrol (Ekstrak plasenta dan neomycin sulfat) hari ke 7 (**Gambar 5.9**) telah nampak banyaknya folikel dan kelenjar sebacea yang terbentuk, terbentuknya jaringan kolagen serta fibroblast yang menyebar pada lapisan dermis (**Gambar 5.9 A**). Lapisan epidermis (**Gambar 5.9 B**) menunjukkan pertumbuhan re-epitelialisasi yang sudah baik karena sudah terjadi penebalan dan terlihatnya semua lapisan epidermis yaitu stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum dan stratum basalis.



Gambar 5.10 Gambaran Histopatologi Kulit Pewarnaan HE Kelompok Tikus Model Luka Bakar Kelompok perlakuan 5% perbesaran 40x (A), 100x (B) dan 400x (C) hari ke 7

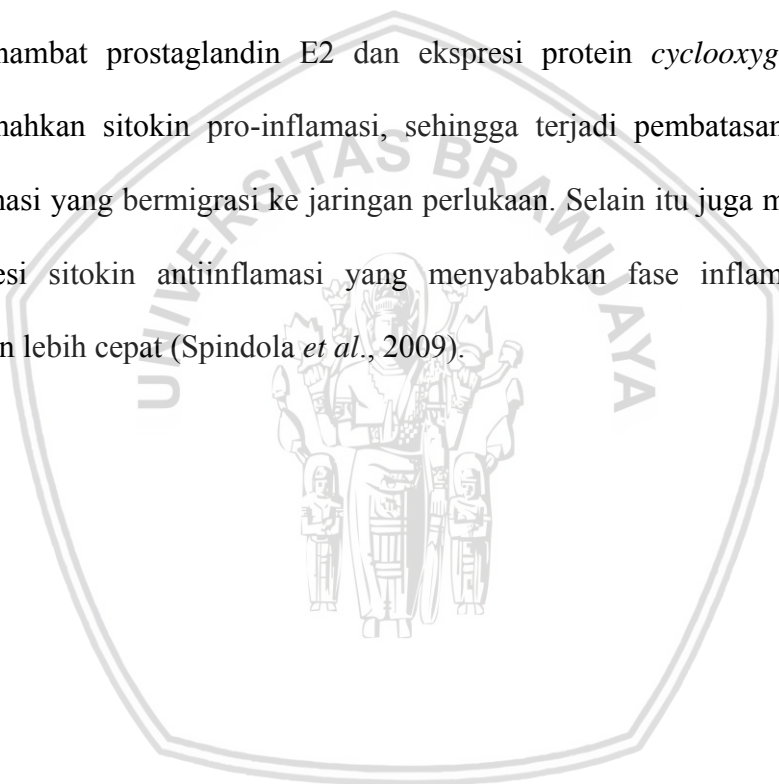
Keterangan : A. Terlihat adanya epidermis (→), dermis (→) dan hipodermis (→) normal
 B. Adanya folikel rambut (FR), kelenjar sebasea (KS) dan jaringan ikat (→) yang baru pada lapisan dermis
 C. Lapisan epidermis menunjukkan stratum granulosum (→), stratum spinosum (→), stratum basal (→) di lapisan epidermis dan sel fibroblas (→) di lapisan dermis.

Gambaran histopatologi kulit kelompok Perlakuan Kitosan 5% hari ke 7 (**Gambar 5.10**) telah nampak banyaknya folikel rambut yang terbentuk, terbentuknya jaringan kolagen serta fibroblast yang menyebar pada lapisan dermis (**Gambar 5.10 A**). Lapisan epidermis (**Gambar 5.10 B**) menunjukkan pertumbuhan re-epitelialisasi yang hampir sama dengan kontrol (Ekstrak plasenta dan neomycin sulfat) hari ke 7 karena sudah terjadi penebalan dan terlihatnya semua lapisan epidermis yaitu yaitu stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum dan stratum basalis.

Berdasarkan gambaran histopatologi di atas, gambaran histopatologi pada kelompok yang diterapi kitosan 5% dan kelompok kontrol positif yang

diterapi Ekstrak plasenta dan neomycin sulfat menunjukkan gambaran yang hampir sama. Hal ini menunjukkan bahwa kitosan 5% efektif membantu proses penyembuhan luka.

Kitosan merupakan biopolimer karbohidrat alami hasil dari deasetilasi dari kitin. Kitosan tersusun dari kopolimer glukosamin dan N-asetilglukosamin. N-asetilglukosamin adalah antiinflamasi yang bekerja dengan cara menghambat prostaglandin E2 dan ekspresi protein *cyclooxygenase-2* dan melemahkan sitokin pro-inflamasi, sehingga terjadi pembatasan jumlah sel inflamasi yang bermigrasi ke jaringan perlukaan. Selain itu juga meningkatkan ekspresi sitokin antiinflamasi yang menyebabkan fase inflamasi berjalan dengan lebih cepat (Spindola *et al.*, 2009).



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Salepek strak kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) 5% mempunyai kemampuan yang sama dengan *gold standard* (kombinasi ekstrak plasenta dan neomisin sulfat) pada terapi luka bakar hari ke 7 menurunkan ekspresi VEGF.
2. Salepek strak kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) 5% mempunyai kemampuan yang sama dengan *gold standard* (kombinasi ekstrak plasenta dan neomisin sulfat) pada terapi luka bakar dalam memperbaiki histopatologi kulit pada proses penyembuhan luka hari ke 7 berdasarkan re-epitelialisasi pada epidermis, pembentukan folikel rambut, kelenjar sebacea, dan jaringan ikat.

6.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut dengan konsentrasi kitosan lain dan aplikasi pengobatan pada jenis luka yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiyati PN. 2011. Ragam jenis ektoparasit pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague dawley. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Akhoondinasab MR., dan M. Saberi. 2014. Comparison of Healing Effect of Aloe vera Extract and Silver Sulfadiazine in Burn Injuries in Experimental Rat Model. *Journal WJPS*.
- Argamula, G. 2008. Aktivitas Sediaan Salep Ekstrak Batang Pohon Pisang Ambon (*Musa paradisiaca*) Var Sapiantum dalam Proses Persembuhan Luka pada Mencit (*Mus musculus albinus*). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor
- AVMA. 2013. *Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*. AVMA.org
- Bacha, W.J., and L.M Wood. 2000. *Color Atlas of Veterinary Histology (2nd edition)*. Lippincott, Williams & Wilkins Publisher, Philadelphia, Pennsylvania,
- Balqis, U., Rasmaidar, dan Marwiyah. 2014. Gambaran Histopatologi Penyembuhan Luka Bakar Menggunakan Daun Kedondong (*Spondias dulcis* f.) dan Minyak Kelapa pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Medika Veterineria* 8(1): 31-36.
- Barbul, A. 2005. *Wound Healing*. In: Principles of Surgery. 8th ed. McGraw-Hill Companies, New York
- Bryant, A.R., and P.D. Nix. 2007. *Acute & Chronic Wounds : Current Management Concepts*, Third Edition. Mosby, St. Louis, Missouri.
- Burhanudin, F.N. 2014. Uji Efektifitas Formulasi Gel Ekstrak Daun Cermay (*Phyllanthus acidus* L.) Terhadap Lama Kesembuhan Luka Bakar Pada Kelinci Jantan. *Skripsi*. Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Ngudi Waluyo, Semarang.
- Chhiber, T., S. Wadhwa, P. Chadha, G. Sharma, and O. P. Katare. 2009. Phospholipid Structured in Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* Involved Burn Wound Infection. *Journal Of Drug Targeting* : ISSN 1061-186X
- Chiba, Y., A. Kamada, S. Sugashima, K. Taya, S. Matsubuchi, T. Saito. 2006. Effects of Intravenous Administration of Chitosan Oligosaccharide on

The Wound Healing Process of Oral Mucosal Injury in Mice. *Ohu University Dental Journal*; 33 (4): 207-213.

Djamaludin, A.M. 2009. Pemanfaatan Khitosan dari Limbah Krustasea Untuk Penyembuhan Luka pada Mencit (*Mus musculus albinus*). *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.

Djawa dan Susilo. 2013. Pengaruh Pemberian Topikal Low Molecular Weight Hyaluronate pada Ekspresi VEGF Luka Superfisial yang Dirawat dengan Membran Amnion Freeze-Dried. *Majalah Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Surabaya* : Surabaya.

Edlich, R.F. 2015. Thermal Burns: Overview, Pathophysiology, Quantifying Burn Severity. Drugs, Diseases and Procedures. *Medscape References*. Pp 1-22.

Eming, S. A., T. Krieg, and J. M. Davidson. 2007, Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms, *J. Invest. Dermatol.*, 127: 415-526.

Evelyn C., and Pearce. 2009. *Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis*.: PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Febram, B.P., I. Wientarsih, dan B. Pontco. 2010. Aktivitas Sediaan Salep Ekstrak Batang Pohon Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var *sapientum*) dalam Proses Persembuhan Luka pada Mencit (*Mus musculus albinus*). *Majalah Obat Tradisional*. 15(3): 121-137

Firdaus, M.F.P., Madyawati, N.S. Widjaja, M. Lamid, K. Rachmawati, S.H Warsito. 2013. Efektifitas Penambahan Kombinasi Tujuh Enzim Terhadap Estimasi Pertumbuhan Berat Badan Sapi Potong Peranakan Simental. *Jurnal Agroveteriner*. 2(1):3.

Galley H. F and N. R. Webster .2004. Physiology Endothelium. *J British Journal of Anesthesia* Vol 93 Hal 105-113

Gayline, A.B., N. R. Pancia, and C. Valerie. 2000. *Delmar's Fundamental and Advanced Nursing Skill*. Delmar, Canada.

Goeser, A.L. 2008. *Kulit, Rambut dan Kuku*. Raylene M Rospond.(8) : 265-271

Gupta V., S. Aditya., K.D Jithendra, C.S Shailendra., and S. Shailesh. Placenta.2016. Extract – the Magical Wound Healer, Next Milestone in the Healing of Periodontal Surgery. *Journal of Dental and Medical Sciences*. Vol. 15 : www.iosrjournals.org

- Gurtner, G.C. 2007. Wound healing, normal and abnormal. In: Thorne CH, Beasley, R.W., Aston, S.J., Bartlett, S.P., Gurtner, G.C., Spear, S.L. (Eds). *Grabb and Smith's plastic surgery*. 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins; p:15-22.Philadelphia
- Guyton, A.C. dan J.E. Hall. 2006. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. (Diterjemahkan Setiawan, I. dan A. Santoso). Edisi ke-9. EGC,Jakarta.
- Hastuti, B., dan N. Tulus. 2015. *Sintesis Kitosan dari Cangkang Kerang Bulu (Anadara Inflata) Sebagai Absorben Ion CU^{2+}* . ISBN: 978-602-73159-0-7.
- Jinab, Y., P.X. Lingab, Y.L. Heb, and T.M. Zhangab. 2006. Effects of Chitosan and Heparin on Early Extension of Burns. *Burns*33 (8): 1027-1031.
- Juwana, S. dan Kasijan Romimohtarto, 2000, *Rajungan Perikanan, Cara Budidaya dan Menu Masakan*. Djambatan, Jakarta.
- Kowalak. 2011. *Buku Ajar Patofisiologi*.EGC, Jakarta.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Leong M, L. G., and Phillips .2012. Wound Healing. Dalam: *Sabiston Textbook of Surgery*. Edisi ke-19. Amsterdam: Elsevier Saunders; h. 984-92
- Mizuno, K., K.Yamamura,K. Yano,T. Osada,S.Saeki, andN. Takimoto. 2002. Effect of Chitosan Film Containing Basic Fibroblast Growth Factor on Wound Healing in GeneticallyDiabetic Mice.*Journal of Biomed Mat Res*.64A (1): 177-181.
- MIMS. 2017. Bioplacenton. *MIMS [Online Journal]*. Tersedia dari; <http://www.mims.com/indonesia/drug/info/bioplacenton>
- Mori, T., M. Okumura, M. Matsuura, K. Ueno, S. Tokura, Y. Okamoto, S. Minami, and T. Fujinaga. 2005. Effects of Chitin and derivates on the Proliferation and Cytokine Production of Fibroblas in Vitro. *Journals Biomaterials*. (13) : 947-51.
- Moenadjat, Y. 2009. *Luka Bakar: Masalah dan Tatalaksana*. Balai Penerbit FKUI, Jakarta.

- Muskar, Y. F. 2007. *Pedoman Teknis Budidaya Kepiting di Tambak*. Fakultas Perikanan Universitas Hasanudin, Makassar
- Naibaho, O.H., V.Y.Y Paulina, dan W. Weny. 2013. Pengaruh Basis Salep Terhadap Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Daun Kemangi (*Omicum sanctum L.*) pada Kulit Punggung Kelinci yang Dibuat Infeksi *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Farmasi Unstrat*: 2(02).
- Nofikasari, Icha, Aqmarina, Fallasofia, Fauzia, dan Handajani. 2016. Efek Aplikasi Topikal Gel Ekstrak Pandan Wangi Terhadap Penyembuhan Luka Gingiva. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia Vol 2*.
- Prianto, E. 2007. Peran Kepiting sebagai Spesies Kunci (Keystone Spesies) pada Ekosistem Mangrove. *Prosiding Forum Perairan Umum Indonesia IV*.
- Putri F. R., dan T. Sri. 2012. Efektivitas Salep Kitosan terhadap Penyembuhan Luka Bakar Kimia pada *Rattus novergicus*. *Jurnal fakultas kedokteran dan kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta Vol 12*, Yogyakarta
- Rachmawati, W., dan D. H Husniati. 2012. Produksi Kitosan dari Bahan Baku Cangkang Udang Menggunakan Metode Kimia dan Enzimatik dengan Enzim Kitin Deasetilase. *Skripsi*. Universitas Lampung, Lampung
- Rajan, V dan R. Murray. 2008. *The duplicitous Nature of Inflammation in Wound RepairWound practice and research*.
- Ramisz A.B., A. W. Pajak, B. Pilarczyk, and R. Alojzy. 2007. The Effect of Chitosan on Body Weight and Protection Against *Salmonella gallinarum* Infection in Broiler Chickens. *Journals Arch. Tierz, Dummerstorf* 50: 3, 288-293
- Santoso, D. 2001. *Ramuan Tradisional Untuk Penyakit Kulit. Edisi Kedua*. Penerbit Penebar Swadaya, Jakarta.
- Scudamore, C.L. 2014. *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*. Mary Lyon Centre, MRC Haewell, UK
- Sedjati, S. 2006. Pengaruh Konsentrasi Kitosan Terhadap Mutu Ikan Teri Asin Kering Selama Penyimpanan Suhu Kamar. *Tesis*. Universitas Diponogoro, Semarang.
- Shelma R., W. Paul, and C.P Sharma. 2008. Chitin Nanofibre Reinforced Thin Chitosan Films for Wound Healing Application. *Trends Biomaterials and Artificial Organs*. 22 (2): 111-115.

- Sirois. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier, USA
- Sjamsuhidajat, dan W.D. Jong. 2005. *Buku Ajar Ilmu Bedah, Edisi II*. EGC, Jakarta
- Smeltzer, S.C., B.G. Bare, J.L. Hinkle, K.H. Cheever. 2010. *Medical surgical Nursing*. 12th edition. Lippincott William Wilkins, Philadelphia.
- Smeltzer, S.C., B.G. Bare. 2001. *Keperawatan Medikal Bedah 2*, Edisi 8. EGC, Jakarta
- Suriadi, MSN. 2007. *Manajemen Luka*. Stikep Muhammadiyah, Pontianak.
- Suriadi. 2004. *Perawatan Luka Edisi I* CV Sagung Seto, Jakarta.
- Syamsuhidayat R. and W. De Jong. 2005. *Buku Ajar Ilmu Bedah* (2nd ed.). EGC, Jakarta. 73-81
- Tango V. T. I. P. 2013. Pengaruh Pemberian Topikal Ekstrak Kulit Delima pada Penyembuhan Luka *Split Thicknes* Kulit Tikus. *Thesis*. Departemen/SMF Ilmu Bedah Plastik Rekonstruksi dan Estetik. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya
- Wulf, B., P. E. Allison., M.A. Mellisa, D.A. Luisa, S.E. Megan, and W.A. Traci. 2012. Mast Cells Contribute to Scar Formation during Fetal Wound Healing. *J Investig Dermatol*
- Xu J., M. D. Kochanek, M. A. Sherry, L. Murphy, B. S. Betzaida. 2010. National Vital Statistics Reports

